

# BÖLN

Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
und andere Formen nachhaltiger  
Landwirtschaft

## Entwicklung von „near isogenic lines“ als Basis zur nachhaltigen Züchtung von Basilikum-Sorten mit Resistenz gegen den Falschen Mehltau

Development of „near isogenic lines“ as basis for sustainable breeding of basil-cultivars with  
resistance against downy mildew

**FKZ: 12NA045**

**Projektnehmer:**

Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzen  
Theodor-Echtermeyer-Weg 1, 14979 Großbeeren  
Tel.: +49 33701 78207  
Fax: +49 33701 55391  
E-Mail: [grosch@igzev.de](mailto:grosch@igzev.de)  
Internet: [www.igzev.de](http://www.igzev.de)

**FKZ: 12NA115**

**Projektnehmer:**

GHG Saaten GmbH  
Albert-Drosihn-Str. 9, 06449 Aschersleben  
Tel.: +49 3473 840070  
Fax: +49 3473 840080  
E-Mail: [info@aschersleben-saaten.de](mailto:info@aschersleben-saaten.de)  
Internet: [www.aschersleben-saaten.de](http://www.aschersleben-saaten.de)

**Autoren:**

Grosch, Rita; Hohe, Annette; Farahani-Kofoet, Roxana Djalali; Römer, Peter

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere  
Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse  
und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam.  
Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer  
Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.

# Schlussbericht

zum

Verbundvorhaben mit dem Titel

## **Entwicklung von „near isogenic lines“ als Basis zur nachhaltigen Züchtung von Basilikum-Sorten mit Resistenz gegen den Falschen Mehltau**

gefördert durch:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung,

53168 Bonn

Geschäftszeichen: 312-06.01-2812NA045

**Laufzeit des Vorhabens:** 01.04.2014 – 31.03.2017

**Projektverlängerung:** bis 12.05.2018

### **Zuwendungsempfänger:**

Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ)

### **Förderkennzeichen: 2812NA045**

System Pflanze Mikroorganismen

Theodor-Echtermeyer-Weg 1

D-14979 Großbeeren

Kontakt: Dr. Rita Grosch

Tel.: 033701-78207

Fax: 033701-55391

e-mail: grosch@igzev.de

GHG Saaten GmbH

### **Förderkennzeichen: 2812NA115**

GHG Saaten GmbH

Albert-Drosihn-Str. 9

06449 Aschersleben

Großbeeren, den 10. Mai 2018

## **Wissenschaftliche Bearbeiter**

Dr. Rita Grosch

Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ), System Pflanze Mikroorganismen,  
Theodor-Echtermeyer-Weg 1, D-14979 Großbeeren

Prof. Dr. Annette Hohe

Fachhochschule Erfurt; zuvor: Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ),  
Kühnhäuser Straße 10, D- 99090 Erfurt

Dr. Roxana Djalali Farahani-Kofoet

Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ), System Pflanze Mikroorganismen,  
Theodor-Echtermeyer-Weg 1, D-14979 Großbeeren

Dr. Peter Römer

GHG Saaten GmbH, Albert-Drosihn-Str. 9, D-06449 Aschersleben

## **Entwicklung von „near isogenic lines“ als Basis zur nachhaltigen Züchtung von Basilikum-Sorten mit Resistenz gegen den Falschen Mehltau**

Rita Grosch<sup>1</sup>, Annette Hohe<sup>2</sup>, Roxana Djalali Farahani-Kofoet<sup>1</sup>, Peter Römer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ), System Pflanze Mikroorganismen, Theodor-Echtermeyer-Weg 1, D-14979 Großbeeren

<sup>2</sup>Fachhochschule Erfurt; Leipziger Str.77, D-99085 Erfurt

<sup>3</sup>GHG Saaten GmbH, Albert-Drosihn-Str. 9, D-06449 Aschersleben

Die Produktion von Basilikum-Frischware erfolgt in hoher Intensität in spezialisierten Betrieben. Der Anbau ist seit einigen Jahren regelmäßig durch das Auftreten des Falschen Mehltaus, verursacht durch den Erreger *Peronospora belbahrii*, bedroht, für deren Kontrolle derzeit keine geeigneten Verfahren zur Verfügung stehen. Eine umwelt-, verbraucher- und produzentenfreundliche Strategie, dem Auftreten des Falschen Mehltaus entgegen zu wirken, ist der Anbau von resistenten Sorten. In einem vorausgegangenen Projekt konnte eine Resistenzquelle bzw. resistenter Basilikumgenotyp aufgefunden werden, die genutzt wurde, um die Resistenz in den vom Verbraucher bevorzugten Genoveser-Typ einzukreuzen. Ziel dieses Projektes war die Erstellung von Near Isogenic Lines (NILs) durch wiederholte Rückkreuzung von bestimmten Elterlinien von Basilikum mit Resistenz gegenüber dem Erreger des Falschen Mehltaus als Basis für eine Marker-basierte Züchtung von Basilikumsorten. Eine vorliegende F2-Population aus Kreuzungen von Genoveser-Typ und dem Wildtyp ‚Apfelbasilikum‘ wurde eine F3-Generation generiert, in der sich einige Pflanzen als resistent erwiesen. Aus weiteren Rückkreuzungen mit dem rekurrenten Elter und einer abschließenden Selbstung wurde die F3BC3-S1 Generation generiert mit 140 resistenten bzw. wenig anfälligen Pflanzen gegenüber dem Falschen Mehltau.

Ein weiteres Ziel des Projektes war, zu prüfen, ob die epidemiologische Entwicklung des Falschen Mehltaus im Basilikumbestand durch Reduktion der relativen Luftfeuchtigkeit unter Gewächshausbedingungen reduziert werden kann. Der Erreger *P. belbahrii* benötigt für die Keimung der Sporen und die Infektion von Basilikum eine bestimmte Blattnässe und –dauer, die durch die Luftfeuchtigkeit im Bestand beeinflusst wird. Um die relative Luftfeuchtigkeit im Bestand von Basilikum zu reduzieren, wurden Gewächshauskabinen mit entsprechenden Heizrohren ausgestattet. In mehreren Sätzen von Basilikum wurde die relative Luftfeuchtigkeit im Bestand in Abhängigkeit von der Vorlauftemperatur in den Heizrohren (40°C) und dem Abstand der Heizrohre zum Tischboden (ca. 9, 15 und 22 cm) im Vergleich zu einem Bestand ohne Wärmezufuhr untersucht. Die Ergebnisse von fünf Versuchen zeigten, die niedrigste rel. Luftfeuchtigkeit im Bestand wurde durch eine Vorlauftemperatur von 40°C mit einem Abstand der Heizrohre von 9 und 15 cm erzielt. Die epidemiologische Entwicklung des Falschen Mehltaus im Bestand wurde daher in Abhängigkeit von den genannten Bedingungen geprüft.

Die Ausbringung des Erreger-Inokulums erfolgte mittels infizierter Pflanzen, die in den Bestand gesetzt wurden. Nachfolgend wurde die epidemische Entwicklung des Falschen Mehltaus im Bestand bonitiert. Durch Reduzierung der relativen Luftfeuchtigkeit konnte die epidemische Ausbreitung des Erregers deutlich reduziert werden. Die Beeinflussung der relativen Luftfeuchtigkeit kann in der Praxis genutzt werden, um dem Auftreten des Falschen Mehltaus entgegen zu wirken.

### **Development of „near isogenic lines“ as basis for sustainable breeding of basil-cultivars with resistance against downy mildew**

Rita Grosch<sup>1</sup>, Annette Hohe<sup>2</sup>, Roxana Djalali Farahani-Kofoet<sup>1</sup>, Peter Römer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops (IGZ), Plant-microbe systems  
Theodor-Echtermeyer-Weg 1, D-14979 Großbeeren

<sup>2</sup>Fachhochschule Erfurt, Leipziger Str.77, D-99085 Erfurt

<sup>3</sup>GHG Saaten GmbH, Albert-Drosihn-Str. 9, D-06449 Aschersleben

The culinary basil is highly produced in specialized companies and is threatened by regularly occurrence of the downy mildew pathogen *Peronospora belbahrii*. Currently no efficient control strategy exists. The cultivation of resistant cultivars is therefore an environmental sound as well as consumer and producer friendly strategy. In a previous project a resistant basil genotype of the wild type was found and crossed with the consumer preferred Genovese type in order to start the introgression of resistance in the Genovese type. The goal of this project was the development of near isogenic lines (NILs) with resistance against downy mildew by repeated backcrossings with the distinct parental lines of basil cultivars. The NILs can be the basis for a marker supported breeding of cultivars resistant against the downy mildew pathogen. Based on available F2-progenies deriving from crossings between Genovese type and the wildtype ‘Apfelbasilikum’ a F3-progeny was generated including some resistant plants. After three back-crossings with the recurrent parent and a final selfing a F3BC3-S1 generation was developed with comprising about 140 resistant or slightly susceptible plants to downy mildew.

A further goal of this project was to assess whether the epidemiological development of the downy mildew disease can be inhibited by reducing of the relative humidity in basil crops under greenhouse conditions. The downy mildew pathogen *P. belbahrii* requires a distinct leaf wetness and duration for germination of spores and infection of basil and thus is affected by the surrounding humidity. For this purpose greenhouse cabins were equipped with heat pipes installed among plants. In several experiments the effect of flow temperature in the heat pipes (40°C) at various distances (ca. 9, 15 and 22 cm)

on the relative humidity in basil crops was compared to the relative humidity in the control crop without heating pipe. The results of five experiments showed that the lowest relative humidity in basil crops was observed at flow temperature of 40°C with a distance of the pipes at 9 or 15 cm. Hence the epidemiological development of downy mildew in basil was tested under these conditions. The epidemic spread of the pathogen was assessed after putting one pot containing one infected plant bearing the pathogen in the crop. The results showed that the reduced relative humidity inhibited clearly the epidemic spread of downy mildew disease and can be part of disease management in practice.

## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	8
Abbildungsverzeichnis .....	9
Abkürzungsverzeichnis .....	12
1. Einführung.....	13
1.1 Gegenstand des Vorhabens .....	13
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes .....	14
1.3 Planung und Ablauf des Projektes.....	16
1.3.1 Herstellung einer NILS-Population (AP1/IGZ) .....	16
1.3.2 Sammlung von <i>P. belbahrii</i> Isolaten aus Praxisbetrieben und deren genotypische Charakterisierung mittels BOX-PCR.....	18
1.3.3 Erstellung und Charakterisierung einer NILs Population von Basilikum (GHG).....	18
1.3.4 Regulierung der relativen Luftfeuchtigkeit im Bestand von Basilikum (AP2/ IGZ) .....	18
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	19
3. Material und Methoden .....	21
3.1 Teil-Projekt IGZ (2812NA045).....	21
3.1.1 Erstellung und Charakterisierung einer Population von NILs von Basilikum und Selektion von Linien mit Resistenz gegen den FM.....	21
3.1.2 Sammlung von <i>P. belbahrii</i> -Isolaten aus Saatgut und Praxisbetrieben und deren genotypische Charakterisierung mittels BOX-PCR.....	25
3.1.3 AFLP Fingerprinting bei <i>Ocimum basilicum</i> L.....	27
3.1.4 Regulierung der relativen Luftfeuchtigkeit im Bestand von Basilikum.....	29
3.2 Teil-Projekt GHG (2812NA115).....	33
3.2.1 Erstellung und Charakterisierung einer NILs Population von Basilikum - GHG .....	33
4. Ergebnis.....	34
4.1. Teil-Projekt IGZ (2812NA045).....	34
4.1.1 Erstellung einer Population von NILs von Basilikum und Selektion von Linien mit Resistenz gegen den FM.....	34
4.1.2 Charakterisierung der Isolate und Prüfung der Anfälligkeit .....	40
4.1.3 AFLP Fingerprinting von Basilikum.....	42
4.1.4 Regulierung der Luftfeuchtigkeit im Bestand von Basilikum.....	47
4.2 Teil-Projekt GHG (2812NA115).....	56
4.2.1 Selektion von 90 NILs mit zufälligem Teil des Genoms des Donor-Elters .....	56
5. Diskussion .....	61
5.1 Diskussion der Ergebnisse des Teilprojektes IGZ.....	61

5.1.1 Erstellung einer Population von NILs von Basilikum und Selektion von Linien mit Resistenz gegen den FM.....	61
5.1.2 Sammlung von <i>P. belbahrii</i> -Isolaten aus Saatgut und Praxisbetrieben und deren genotypische Charakterisierung mittels BOX-PCR.....	63
5.1.3 Homogenitätsprüfung von Basilikumsorten mittels AFLP Technik .....	64
5.1.3 Regulierung der relativen Luftfeuchtigkeit im Bestand von Basilikum.....	64
5.2 Diskussion der Ergebnisse des Teilprojektes GHG.....	65
5.2.1 Erstellung und Charakterisierung einer NILs Population von Basilikum - GHG .....	65
6. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	66
7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Ziele .....	66
8. Zusammenfassung .....	68
9. Literaturverzeichnis.....	69
10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt; bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse .....	71

## Tabellenverzeichnis

Tab.1: Entwicklung von NILs auf Grundlage von Resistenzprüfungen und Kreuzungen GHG Saaten GmbH/IGZ) .....	22
Tab. 2: Boniturschema des FM an Basilikum .....	25
Tab. 3: Isolate und Herkunft von <i>P. belbahrii</i> isoliert vom Genoveser Basilikum-Typ .....	26
Tab.4: Botanische Namen mit den entsprechenden Sorten verwendeter Pflanzen .....	28
Tab. 5: Entwicklung zufällige NILs - Generationsfolge (GHG Saaten GmbH) .....	34
Tab. 6: Geprüfte Genotypen der F3BC1 auf Resistenz gegen FM .....	37
Tab. 7: Befallshäufigkeit und Befallsstärke der geprüften F3BC2-Nachkommen 58M1, 58M2, 58M3, 58M4 .....	37
Tab. 8: Selektierte Pflanzen (gering anfällig) der F3BC3-Nachkommenschaft 58M1, 58M2, 58M3 und 58M4 .....	38
Tab. 9: Einfluss von Temperatur und Klon-Alter auf Anfälligkeit von F3-Genotypen 10 dpi.....	39
Tab. 10: Befallsstärke und Befallshäufigkeit bei verschiedenen Behandlungs/Kultivierungs- Varianten von F3-Genotypen 10 dpi.....	39
Tab. 11: Befallsstärke und Befallshäufigkeit von vier Klonen der F3BC1-Generation 10 dpi.....	40
Tab. 12: Verwendete Primerkombinationen des Homogenitätstests.....	42
Tab. 13: Bestimmung der Homogenität anhand von 200 AFLP-Markern (Bins).....	43
Tab. 14: Verteilung der polymorphen Marker unter den abweichenden Pflanzen.....	44
Tab. 15: Aufschlüsselung der abweichenden Proben innerhalb der Sorten mit Angabe der Abweichungen von Hauptgruppe (%) und maximalen Abweichung (%) .....	45
Tab. 16: Verwendete Primerkombinationen des Sorten-Vergleichs .....	45
Tab. 17: Genetischer Unterschied zwischen den Sorten und Arten(%) .....	46
Tab. 18: Anzahl der zufälligen NILs, der angebauten Pflanzen und der gelungenen Kreuzungen in den Projektjahren 2014, 2015 und 2016.....	57
Tab. 19: Prozentuale Anteile der Pflanzen mit den Haupt-Merkmalskombinationen (ohne Blütenfarbe) in den Jahren 2014 bis 2016 .....	58
Tab. 20: Prozentuale Anteile der Pflanzen mit den Haupt-Merkmalskombinationen unter Einbeziehung der Blütenfarbe in den Jahren 2014 bis 2016.....	59

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schema zur Erstellung der NILs Population von Basilikum .....	17
Abb. 2:	Schema der durchgeführten Kreuzungen und Rückkreuzungen zur Introgression der FM Resistenz in den Genoveser Typ .....	21
Abb. 3:	Versuchsaufbau in den Gewächshauskabinen zur Prüfung des Einflusses der Kulturführung auf die relative Luftfeuchtigkeit; Tischen ausgestattet mit Heizrohre (T1, T2, T4) und ohne Heizrohre (T3).....	30
Abb. 4:	Tisch mit Heizrohren im Bestand in der Gewächshauskabine .....	31
Abb. 5:	Schema der Ausbringung des FM Inokulums (gelb) auf zwei Flächen (ca. 150 cm) auf einem Tisch in der Gewächshauskabine mit jeweils zwei Luftfeuchtigkeit- und Temperatur-Sensoren (x) .....	33
Abb. 6:	Pathogenität von <i>P. belbahrii</i> Isolat, getestet an den Basilikumsorten BAVIRES (B) und ‚Eleonora‘ €, anhand der BS und BH 12 dpi in Versuch 1 und 2; *signifikant verschieden zum Referenzisolat ZM13 im jeweiligen Versuchsblock; zweiseitiger Dunnett-Test, p=0,05. Befallsstärke und Befallshäufigkeit.....	41
Abb. 7:	BOX-PCR-Fingerprints von <i>P. belbahrii</i> Isolat (1=PA14; 2=ZM13; 3=RAJ13; 4=BN16; 5=HD15; 6=HILD12; 7=MT3; 8=MT4; 9=LHM14; 10=PRA13; 11=DO16; 12=HAN14) PK: Positivkontrolle ( <i>Rhizoctonia solani</i> ); NK: Negativkontrolle; M: Marker (1kb) .....	42
Abb. 8:	AFLP-Fingerprints von 50 BAVIRES-Proben (Klammer 1) und der sechs Sorten der Out-Group <i>O. tenuiflorum</i> L.; <i>O. basilicum</i> L. ‚Zanzibar‘, <i>O. basilicum</i> var. <i>Thyriflora</i> L.; <i>O. micranthemum</i> L.; <i>O. basilicum</i> L. ‚Provence‘; <i>O. basilicum</i> L. ‚Korsisches Basilikum‘(Klammer 2) .....	43
Abb. 9a:	Abb. 9a: Temperatur und rel. Luftfeuchtigkeit (rF) im Bestand von Basilikum bei einer Vorlauftemperatur in den Heizrohren von 40°C und in Abhängigkeit vom Abstand der Heizrohre zum Tisch: 22 cm (blau); 15 cm (rot); 9 cm (lila); 0 (grün); aus vier Basilikumsätze (V1, V2, V3, V4) um 6.00 .....	49
Abb. 9b:	Temperatur und rel. Luftfeuchtigkeit (rF) im Bestand von Basilikum bei einer Vorlauftemperatur in den Heizrohren von 40°C und in Abhängigkeit vom Abstand der Heizrohre zum Tisch: 22 cm (blau); 15 cm (rot); 9 cm (lila); 0 (grün); für einen ausgesuchten Tag im 6-Blatt-Stadium von Basilikum aus vier Versuchen (V1, V2, V3, V4) .....	50
Abb. 10a:	Prozentualer Anteil mit FM befallener Basilikum-Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit (rF), variiert durch installieren von Heizrohre über dem Bestand (Tische T1, T2, T4), im Vergleich zur BH zur Kontrollvariante ohne Heizrohre (T3). Der Verlauf der rF und Temperatur erfolgte ab 6.00 Uhr	

	vom 13.4. (Inokulation des Bestandes mit FM) bis 1.5.2017. Die BH wurde 10 Tage nach der Inokulation (dpi) erfasst. sp-: keine Erregersporulation; sp+: Erregersporulation auf den Blättern.....	51
Abb. 10b:	Prozentualer Anteil mit FM befallener Basilikum-Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit (rF), variiert durch installieren von Heizrohre über dem Bestand (Tische T1, T2, T4), im Vergleich zur BH zur Kontrollvariante ohne Heizrohre (T3). Der Verlauf der rF und Temperatur erfolgte ab 6.00 Uhr vom 23.5. (Inokulation des Bestandes mit FM) bis 6.6.2017. Die BH wurde 10 Tage nach der Inokulation (dpi) erfasst. sp-: keine Erregersporulation; sp+: Erregersporulation auf den Blättern.....	52
Abb. 10c:	Prozentualer Anteil mit FM befallener Basilikum-Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit (rF), variiert durch installieren von Heizrohre über dem Bestand (Tische T1, T2, T4), im Vergleich zur BH zur Kontrollvariante ohne Heizrohre (T3). Der Verlauf der rF und Temperatur erfolgte ab 6.00 Uhr vom 2.7. (Inokulation des Bestandes mit FM) bis 16.7.2017. Die BH wurde 10 Tage nach der Inokulation (dpi) erfasst. sp-: keine Erregersporulation; sp+: Erregersporulation auf den Blättern.....	53
Abb. 10d:	Prozentualer Anteil mit FM befallener Basilikum-Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit (rF), variiert durch installieren von Heizrohre über dem Bestand (Tische T1, T2, T4), im Vergleich zur BH zur Kontrollvariante ohne Heizrohre (T3). Der Verlauf der rF und Temperatur erfolgte ab 6.00 Uhr vom 1.10. (Inokulation des Bestandes mit FM) bis 15.10.2017. Die BH wurde 10 Tage nach der Inokulation (dpi) erfasst. sp-: keine Erregersporulation; sp+: Erregersporulation auf den Blättern.....	54
Abb. 11:	Mittlerer prozentualer Anteil mit FM befallener Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) auf den Tischen T1, T2, T3 und T4 (mit Heizrohre) und T4 (ohne Heizrohre) unter Gewächshausbedingungen aus vier Versuchen. Balken stellen den errechneten Konfidenzintervall dar .....	54
Abb. 12:	Prozentualer Anteil mit FM befallener Basilikum-Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit (rF), variiert durch installieren von Heizrohre über dem Bestand (Tische T1, T2, T4), im Vergleich zur BH zur Kontrollvariante ohne Heizrohre (T3). Der Verlauf der rF und Temperatur erfolgte ab 6.00 Uhr vom 17.4. (Inokulation des Bestandes mit FM) bis 1.5.2018. Die BH wurde 10 Tage nach der Inokulation (dpi) erfasst. sp-: keine Erregersporulation; sp+: Erregersporulation auf den Blättern. In diesem Versuch wurden Pflanzen der F3BC3-S1 Generation .....	55

- Abb. 13: Prozentualer Anteil mit FM befallener Basilikum-Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit (rF), variiert durch installieren von Heizrohre über dem Bestand (Tische T1, T2, T4), im Vergleich zur BH zur Kontrollvariante ohne Heizrohre (T3). In diesem Versuch wurde die epidemische Ausbreitung von FM auf BAVIRES und Pflanzen der F3BC3-S1 Generation geprüft. Auf den Tischen gekennzeichnet mit \* wurde die Ausbreitung von FM nur auf BAVIRES geprüft..... 56
- Abb. 14: Prozentuale Anteile der Pflanzen mit den Haupt-Merkmalkombinationen in den Jahren 2014 bis 2016 (Abk. siehe Tab. 20)..... 58
- Abb. 15: Prozentuale Anteile der Pflanzen mit den Haupt-Merkmalkombinationen unter Einbeziehung der Blütenfarbe in den Jahren 2014 bis 2016 (Abk. siehe Tab. 21) ..... 60

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AP	Arbeitspaket
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BC1	Back Cross (Rückkreuzung), erste Generation
BH	Befallshäufigkeit
BND	Blattnässedauer
BS	Befallsstärke
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dpi	Days post inoculation, Tage nach Inikulation
F	Filialgeneration
FM	Falscher Mehltau
GHG	GHG Saaten GmbH
IGZ	Institut für Gemüse und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.
Kb	kilobases
M	Mutter
min	Minuten
ml	Milliliter
N	Anzahl geprüfter Pflanzen
ng	nanogramm
NILs	Near Isogenic Lines
PCR	Polymerase chain reaction
R	reziprok
rF	relative Luftfeuchtigkeit
S1	Selbstung, erste Generation
T	Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U	Unit
V	Vater
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol

## 1. Einführung

Seit 2003 ist das Auftreten von Falschem Mehltau (FM) an Basilikum (*Ocimum basilicum*) regelmäßig im kommerziellen Anbau zu beobachten (Schmidt 2004). Basilikum wird unter Gewächshausbedingungen produziert, die ideale Befalls- und Ausbreitungsbedingungen für den Erreger bieten. Die Produktion von Frischware für den Verkauf im Lebensmitteleinzelhandel erfolgt in großem Umfang in auf die Produktion von Basilikum bzw. Kräutern spezialisierten Betrieben. Ausgehend von einem Anbaugebiet am Bodensee (Insel Reichenau) verbreitete sich der FM an Basilikum ab 2003 auch auf nördliche Anbaugebiete. So tritt die Krankheit in teilweise erheblichem Ausmaß auch im Raum Papenburg, dem größten deutschen Anbaugebiet von Küchenkräutern, auf. Die Krankheit kann sich sehr schnell in einem Bestand ausbreiten. Töpfe mit befallenen Pflanzen lassen sich nicht mehr verkaufen und stellen einen großen wirtschaftlichen Schaden für den Produzenten dar. Nur optisch einwandfreie Ware lässt sich vermarkten. Eine Bekämpfung des Erregers, *Peronospora belbahrii*, mit Pflanzenschutzmitteln ist aufgrund fehlender Zulassungen von Pflanzenschutzmittel nicht möglich. Außerdem handelt es sich um Frischware, die frei von jeglicher chemischer Belastung sein muss. Die Übertragung der Krankheit über das Saatgut ist eine wichtige Quelle sowohl für den Primärbefall von Basilikum mit *P. belbahrii* als auch für dessen Verbreitung im Bestand unter Gewächshausbedingungen bzw. im Anbaugebiet. Bisherige Versuche, den FM auf chemischem Wege durch Saatgutbeizung oder physikalisch durch Heissdampfbehandlung des Saatgutes zu bekämpfen, erwiesen sich als wenig effizient. Derzeit stehen daher der Praxis keine erfolgreichen Bekämpfungsverfahren zur Verfügung. Der Anbau resistenter Sorten stellt daher sowohl eine umwelt- als auch verbraucher- und produzentenfreundliche Strategie dar.

### 1.1 Gegenstand des Vorhabens

Hierbei werden genetische Ressourcen aus Wildformen durch ein gezieltes Rückkreuzungsprogramm züchterisch nutzbar gemacht. Durch die Charakterisierung dieses Zuchtmaterials mithilfe molekularer Marker sollte zudem eine zukünftige markergestützte Selektion resistenter Genotypen ermöglicht werden, die so in zukünftige Züchtungsprogramme aufgenommen werden können. Das Projekt leistet einen Beitrag zur nachhaltigen Erzeugung von gärtnerischen Produkten und Wahrung hoher Qualitätsstandards. Die Produktion von Basilikum-Frischware erfolgt in hoher Intensität in spezialisierten Betrieben und ist durch das regelmäßige Auftreten des FM-Erregers *P. belbahrii* bedroht. Der Anbau resistenter Sorten ist sowohl eine umwelt- als auch verbraucher- und produzentenfreundliche Strategie. Hierbei werden genetische Ressourcen aus Wildformen durch ein gezieltes Rückkreuzungsprogramm züchterisch nutzbar gemacht. Durch die Charakterisierung dieses Zuchtmaterials mithilfe molekularer Marker sollte zudem eine zukünftige markergestützte Selektion resistenter Genotypen ermöglicht werden, die so in zukünftige Züchtungsprogramme aufgenommen werden können. Das Projekt leistet

einen Beitrag zur nachhaltigen Erzeugung von gärtnerischen Produkten und Wahrung hoher Qualitätsstandards.

## **1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes**

Die wichtigsten wissenschaftlichen Ziele des Vorhabens waren:

### **AP 1 - Erstellung einer NILS-Population**

1. Erstellung und Charakterisierung einer Population von NILs von Basilikum (GHG/IGZ)
  - Selektion von mindestens 10 NILs mit Resistenz gegenüber *P. belbahrii*
  - Selektion von 90 NILs mit zufälligem Teil des Genoms des Donor-Elters
2. Selektion von Linien mit Resistenz gegen den FM (IGZ/GHG)
  - Sammlung von *P. belbahrii* Isolaten aus Praxisbetrieben und deren genotypische Charakterisierung mittels BOX-PCR
  - Prüfung der Resistenz gegenüber *P. belbahrii* an allen folgenden Rückkreuzungsgenerationen, jeweils anhand von deren Selbstungsnachkommenschaft
3. Molekulare Charakterisierung der NILS (IGZ)
  - Anpassung der AFLP-Methodik und Validierung für die Nutzung an Basilikum
  - Aufbau einer Kartierungspopulation
  - Aufklärung des Erbgangs in den einzelnen Selbstungs- und Rückkreuzungspopulationen
  - Identifizierung von AFLP-Markern für die Resistenz

### **AP 2 - Regulierung der relativen Luftfeuchtigkeit in der Topfkultur**

4. Regulierung der Blattnässedauer (BND) in der Topfkultur (IGZ)
  - Ermittlung der BND bei derzeit üblicher Pflanzendichte in der Topfkultur
  - Prüfung der Krankheitsentwicklung in Abhängigkeit von der BND an Basilikum

Ziel des Projektes war die Erstellung und Charakterisierung einer Population von NILs von Basilikum als Basis für die Züchtung von Basilikumsorten mit Resistenz gegenüber dem FM. In den derzeit vorhandenen resistenten Pflanzen dominiert nach wie vor der Wildpflanzencharakter, welcher durch Rückkreuzungen mit Genoveser Typen zu eliminieren ist. Diese Rückkreuzungen zur Erstellung von NILs genutzt werden, um so die Introgression der gewünschten Mehltaresistenz mit dem Aufbau einer Kartierungspopulation als Basis zukünftiger markergestützter Züchtungsmethoden zu kombinieren. Um beide Arbeitsziele zu erreichen, sollten insgesamt 110 NILs erstellt werden mit 20 NILs mit Resistenz gegenüber dem FM, um zu gewährleisten, dass einige NILs das gewünschte Merkmal aufweisen, während die anderen 90 NILs jeweils einen zufälligen Teil des Genoms des donor parents enthalten und somit weitere potentiell wünschenswerte Eigenschaften.

Ziel des Rückkreuzungsprogrammes war über die Ermittlung der Spaltungsverhältnisse des Merkmals „Resistenz gegenüber FM“ (anfällig, resistent, wenig anfällig bzw. tolerant) in den einzelnen Selbstungs- und Rückkreuzungspopulationen auch den Erbgang dieses Merkmals aufzuklären. Diese Information ist für die weitere Entwicklung von Züchtungsstrategien mit resistenten Linien von großer Bedeutung.

Die NIL-Population sollte für eine zukünftige Kartierung und Entwicklung markergestützter Selektionsverfahren genutzt werden einschließlich von AFLP-Markern, die eine Identifizierung der Resistenz erlauben. Gleichmaßen können die NIL-Population genutzt werden, um weitere Eigenschaften, in denen sich die Elterntypen unterscheiden wie z.B. bestimmte Geschmacks- oder Geruchskomponenten, genetisch zu charakterisieren und diese analog der Resistenz für den FM züchterisch nutzbar zu machen.

Im Rahmen des Projektes sollte zusätzlich geprüft werden, ob die epidemiologische Entwicklung des FM an Basilikum durch Unterschreitung einer bestimmten Blattnässedauer, die für die Keimung der Sporen, Infektion und Sporulation gegeben sein muss, gehemmt werden kann. Die Einführung solch einer Maßnahme kann ein effektiver Bestandteil des Resistenzmanagements in der Praxis sein.

### **Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen (z.B. Förderprogramm)**

Die Bereitstellung molekularer Marker zur Selektion resistenter Genotypen von Basilikum eröffnet erstmals die Möglichkeit, entsprechende Resistenzmerkmale in das Züchtungsprogramm aufzunehmen und zukünftig Basilikumsorten mit Resistenz gegen *P. belbahrii* für den Anbau in der Praxis bereitzustellen. Mit der Unterstützung der Züchtung von resistenten Basilikumsorten mittels molekularer Marker leistet das Projekt einen Beitrag zur nachhaltigen Erzeugung landwirtschaftlicher Produkte entlang der Wertschöpfungskette. Erreger des FM beeinträchtigen bei einer Vielzahl von gärtnerischen Kulturen die Produktion. Die Charakterisierung einer Population von NILs von Basilikum eröffnet beispielhaft die Möglichkeit der Züchtung von resistenten Sorten gegenüber dem FM für gärtnerische Kulturen. Das Projekt leistet einen Beitrag zur Förderung des Ökologischen Landbaus infolge der Schließung von Wissenslücken einschließlich eines raschen Wissenstransfers in die Praxis.

Das Forschungsvorhaben nimmt Bezug zu folgenden förderpolitischen Zielen der Bundesregierung:

- (1) Biologische, chemische und andere Pflanzenschutzverfahren,
- (2) Verbesserung des Resistenzmanagements für Schadorganismen und
- (3) Verfahren zur zielgerichteten Ermittlung von Wirt-Parasit-Beziehungen und pflanzlichen Resistenzmechanismen.

Die zu erschließenden biologischen Maßnahmen des Forschungsvorhabens erfüllen in besonderer Weise die Förderkriterien: neue integrierte Pflanzenschutz-Verfahren zu erschließen, biologische und chemische Pflanzenschutzverfahren zu optimieren und praktisch zu nutzen.

Zusätzlich war zu prüfen, ob die Krankheitsentwicklung des FM sowohl an der Pflanze als auch im Basilikumbestand durch geeignete Maßnahmen der Kulturführung kontrolliert werden kann. Für die Infektion des Erregers an Basilikum ist eine bestimmte Blattnässedauer von mindestens 6 h notwendig. Daher war zu untersuchen, ob die epidemiologische Entwicklung von *P. belbahrii* an Basilikum durch Unterschreitung der notwendigen Blattnässedauer in der Topfkultur durch Reduktion der relativen Luftfeuchtigkeit im Bestand gehemmt werden kann. Solch eine Maßnahme würde auch die angestrebte Resistenz von Sorten schützen.

### **1.3 Planung und Ablauf des Projektes**

#### **1.3.1 Herstellung einer NILS-Population (AP1/IGZ)**

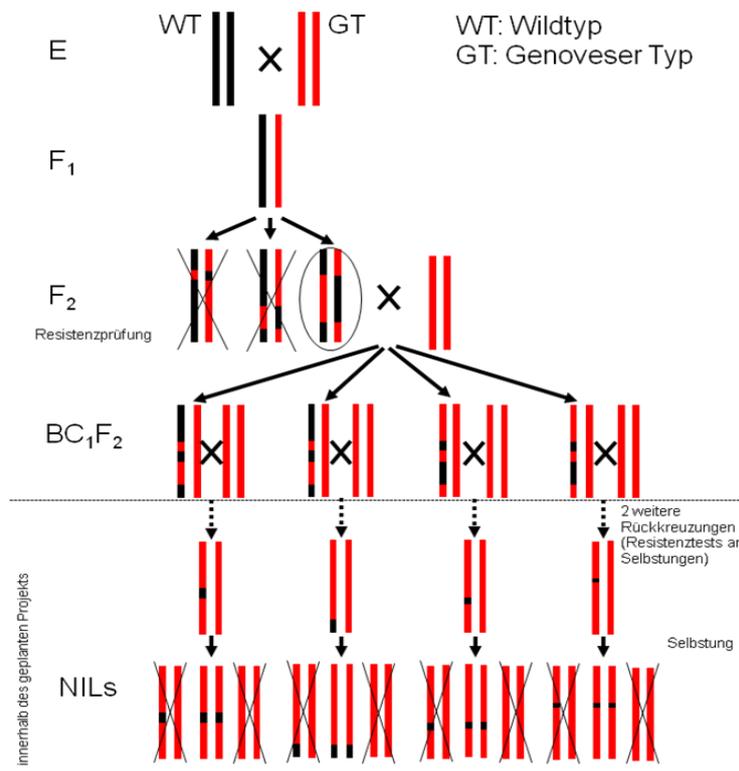
##### **1.3.1.1 Erstellung und Charakterisierung einer Population von NILs von Basilikum und Selektion von Linien mit Resistenz gegen den FM**

Die vorgesehenen Versuche wurden in enger Kooperation der beteiligten Projektpartner im Rahmen des Projektes sowohl geplant als auch durchgeführt. Alle Kreuzungsarbeiten und Resistenztests wurden am IGZ durchgeführt.

Nach Auffinden von gegenüber dem FM resistentem Basilikummaterial (siehe Projekt FKZ: 28-1-41.012-06) wurden Kreuzungen von anfälligem Genoveser-Typ und zwei resistenter Wildformen (Exot 1: Apfelbasilikum; Exot 2: Heiliges Basilikum) mit dem Ziel durchgeführt, die Resistenz in den von Verbraucher und Produzenten bevorzugten Genoveser-Typ einzukreuzen (GHG). Die Einkreuzung von resistentem Material in den Genoveser-Typ erforderte mehrere Rückkreuzungen und die Überprüfung der Nachkommenschaft auf Resistenz gegenüber dem FM (Abb.1).

Als Ausgangsmaterial für den Projekt-Start war das bereits vorliegende Saatgut F2BC1, das aus einer ersten Rückkreuzung von ausgewählten resistenten F2 Pflanzen (nach deren Selbstung) mit dem Genoveser Elter BAVIRES vor Beginn des Projektes bei GHG durchgeführt wurde, vorgesehen. Ziel war, mindestens 10 NILs mit Resistenz gegenüber FM zu bekommen. Parallel wurden am IGZ die Nachkommen aus den Rückkreuzungen zusätzlich geselbstet und anschließend auf Resistenz gegen FM geprüft.

Um den eventuellen Einfluss von Kultur- und Umweltbedingungen (z.B. in der Anatomie des Blattaufbaus oder der Behaarung, Umweltvarianz) auf das Resistenzverhalten von Sämlingen zu prüfen, wurden resistente Nachkommen-Pflanzen vegetativ vermehrt (geklont) und in zwei unterschiedlichen Altersstadien und bei zwei Temperaturvarianten kultiviert und nochmals auf ihre Resistenz gegen FM geprüft.



**Abb. 1:** Schema zur Erstellung der NILs Population von Basilikum

### Molekulare Charakterisierung der NILs (IGZ)

Die NIL-Population sollte für eine zukünftige Kartierung und Entwicklung markergestützter Selektionsverfahren genutzt und AFLP-Marker für die Resistenz identifiziert werden. Die AFLP-Methode (Vos et al. 1995 Borchert und Gawenda 2010) war für die Nutzung an Basilikum anzupassen und zu validieren. Hierfür wurden zunächst Primer selektiert. In diesen Untersuchungen wurden fünf unterschiedliche Genotypen (einschließlich Elterngenotypen: zwei Donor-Eltern/Wildtypen und rekurrente Elter) einbezogen, um im Vergleich der Elterngenotypen eine große Anzahl polymorpher Banden aufzufinden. Für jeden der Donor-Eltern sollten mindestens 100 polymorphe Marker charakterisiert werden, die nur im Wildtyp auftreten.

Auf der Basis eines umfangreichen Screenings von AFLP-Primern zu Beginn des Projektes erfolgte eine Auswahl von optimalen Primer-Kombinationen. Insgesamt wurden 168 verschiedene Primerkombinationen zur molekularen Charakterisierung von NILs ausgewählt. Ausgehend von diesen Primer-Kombinationen sollten molekulare Marker mittels AFLP, die resistente DNA-Abschnitte eines Genotyps (NILs) aufzeigen, identifiziert werden. Diese Arbeiten mussten eingestellt werden, da sich nach den ersten Resistenzprüfungen herausstellte, dass die Vererbung der Resistenz nicht monogen verläuft und die Vererbung der Resistenz an den Nachkommen nicht klar zu erkennen war. Aus die-

sem Grund wurde sich auf die Arbeiten zum geplanten Rückkreuzungsprogramm konzentriert, welches sich als sehr umfangreich erwies.

Die etablierte AFLP-Methode zur Charakterisierung von Basilikum wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit mit dem Titel: „AFLP fingerprinting bei *Ocimum basilicum* L.“ zur Untersuchung der Homogenität dreier Genoveser Basilikum-Typen und Unterscheidung von Basilikum-Sorten und -Arten angewandt (Seliger 2017).

### **1.3.2 Sammlung von *P. belbahrii* Isolaten aus Praxisbetrieben und deren genotypische Charakterisierung mittels BOX-PCR**

Im Rahmen des Projektes wurde die vorhandene Sammlung von *P. belbahrii* Isolaten aus Praxisbetrieben erweitert und deren genotypische Charakterisierung mittels BOX-PCR vorgenommen. Es wurde an zwei verschiedenen Basilikum-Sorten geprüft, inwieweit die Pathogenität der Isolate verschieden ist, um eventuell darauf zurückgreifen zu können (IGZ).

### **1.3.3 Erstellung und Charakterisierung einer NILs Population von Basilikum (GHG)**

#### **1.3.3.1 Selektion von 90 NILs mit zufälligem Teil des Genoms des Donor-Elters**

Aufgabe der GHG Saaten GmbH war die Erstellung und Charakterisierung einer Population von Near Isogenic Lines (NILs) von Basilikum mit zufälligem Teil des Genoms des Donor-Elters. Hierzu sollten 90 Rückkreuzungs-Nachkommenschaften verwendet werden. Diese waren entstanden aus der Kreuzung des Resistenzdonors „Heiliges Basilikum“ mit der Sorte BAVIRES (Genoveser Typ) und der anschließenden Rückkreuzung mit BAVIRES.

In den Projektjahren 2014, 2015 und 2016 wurden diese 90 Nachkommenschaften jeweils mit dem Genoveser Elter BAVIRES (als Vaterpflanze) zurückgekreuzt, um so den Genom-Anteil des Genoveser Typs in den Rückkreuzungsgenerationen sukzessive zu erhöhen.

Nach genehmigter Verlängerung des Projektes wurden 22 Rückkreuzungen mit geringer Anfälligkeit gegenüber dem FM (geprüft am IGZ) im Labor der GHG Saaten GmbH in Gewebekultur übernommen, um möglichst viele erbgleiche Pflanzen zu produzieren und aus diesen Saatgut durch Selbstung der Pflanzen zu erzeugen. Die aus diesen Samen entstehenden Pflanzen wurden wiederum auf ihre Anfälligkeit gegen den FM am IGZ in Großbeeren getestet.

#### **1.3.4 Regulierung der relativen Luftfeuchtigkeit im Bestand von Basilikum (AP2/ IGZ)**

Neben der Entwicklung einer resistenten Basilikumsorte, wurde geprüft, ob die epidemiologische Entwicklung des FM im Basilikumbestand durch Reduzierung der relativen Luftfeuchtigkeit (rF) unter

Gewächshausbedingungen verhindert werden kann. Diese Kulturmaßnahme würde auch dazu beitragen, die Resistenz der Sorte zu schützen. Geprüft wurde:

- die rF bei derzeit üblicher Pflanzendichte in der Topfkultur,
- die Veränderung der rF im Bestand nach Erhöhung der Temperatur im Bestand sowie
- die Krankheitsentwicklung in Abhängigkeit von der rF im Bestand von Basilikum.

Zur Reduzierung der rF wurde die Temperatur im Bestand erhöht. Dazu wurden Heizrohre über dem Bestand von Basilikum angeordnet und die rF mittels Sensoren erfasst. In fünf Versuchen zu verschiedenen Zeitpunkten im Jahr wurde der Einfluss des Abstands der Heizrohre zum Bestand auf die rF bei einer Vorlauftemperatur von 40°C ermittelt. Des Weiteren wurde im Verlauf eines Vegetationsjahres in vier Basilikumsätzen die Verbreitung des Erregers des FM (*P. belbahrii*) im Bestand bei reduzierter rF bonitiert. Hierbei wurde der Abstand der Heizrohre zum Bestand mit dem wirksamsten Einfluss auf die rF eingestellt.

## **2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

Der biotrophe oomycete Erreger des FM an Basilikum (*Ocimum basilicum*), charakterisiert als *Peronospora belbahrii* Thines sp. nov. (Belbahri et al. 2005; Thines et al. 2009), ist ein destruktiver Erreger, der weltweit in der Basilikumproduktion auftritt. Seit 2001 ist der Erreger verantwortlich für jährlich auftretende Epidemien und ökonomisch relevante Verluste in der Basilikumproduktion in ganz Europa einschließlich Deutschland (Heller & Baroffio 2001; Garibaldi et al. 2004, Schmidt 2004, Wyenandt et al. 2010). Epidemien gehen meist von einzelnen infizierten Pflanzen aus und werden durch die Produktionsbedingungen begünstigt (Garibaldi et al. 2007). Die Verbreitung der Krankheit erfolgt in erster Linie über das mit *P. belbahrii* befallene Saatgut, welches verantwortlich ist für den Primärbefall (Garibaldi et al. 2004, Belbahri et al. 2005, Djalali Farahani-Kofoet et al. 2012). Aufgrund der Windbürtigkeit der asexuell gebildeten Sporen breitet sich der Erreger sehr rasch nicht nur im Bestand sondern z. B. durch geöffnete Belüftungsklappen der Gewächshäuser auch im gesamten Anbaugebiet aus.

Die Krankheit ist auch in Deutschland verbreitet, unter anderem im Raum Papenburg, dem größten deutschen Anbaugebiet von Küchenkräutern mit einer Basilikum-Anbaufläche von ca. 25 ha unter Glas und einer Jahresproduktion von ca. 50 Millionen Töpfen. Der wirtschaftliche Verlust durch den Befall von Basilikum mit *P. belbahrii* eines einzigen Gärtners wird nach dessen Angaben für das Jahr 2010 auf etwa 100.000 Euro geschätzt. Da der Befall in mehreren Gärtnereien auftrat, dürfte sich der Schaden insgesamt auf ein Vielfaches dieses Betrages belaufen. Auch im Sommer 2011 und 2012 kam es nach Aussagen aus der Praxis wieder zu erheblichen Verlusten in der Basilikumproduktion durch den Erreger. Die Bekämpfung des FM mit Blattfungiziden ist wegen der kurzen Wachstumsdauer von Basilikum (4 bis 6 Wochen) und der damit verbundenen Rückstandsproblematik nur sehr begrenzt

möglich. Besonders schwierig ist die Kontrolle des Pilzes in ökologisch wirtschaftenden Gärtnereien. Einzelne Betriebe haben ihre Basilikum-Produktion aus diesem Grund wieder auf die konventionelle Anbautechnik umgestellt. Eine effiziente Bekämpfungsmaßnahme ist derzeit nicht verfügbar. Der Anbau resistenter Sorten ist nicht nur eine umweltfreundliche sondern auch sehr effektive Pflanzenschutzmaßnahme bei gleichzeitiger Wahrung eines hohen Qualitätsstandards.

Im Rahmen des Verbundprojektes „Entwicklung von Zuchtmaterial von Basilikum (*Ocimum basilicum*) mit Resistenz gegen FM (*Peronospora* sp.) und erhöhter Kältetoleranz“ (FKZ: 511-06.01-28-1-41.022-06) wurden Pflanzen mit Resistenz gegenüber dem FM selektiert, die intermediären Charakter aufweisen und somit nicht marktfähig sind. Allen resistenten Pflanzen fehlt insbesondere der Basilikum-typische Geruch und Geschmack. Durch Rückkreuzungen mit den Genoveser Typen musste nun ein vom Verbraucher akzeptierter Pflanzentyp mit Resistenz gegen FM generiert werden.

Ziel des Projektes war daher, ausgehend von dem bereits selektierten resistenten Pflanzenmaterial, die Bereitstellung von Basismaterial für die Züchtung von vermarktungsfähigen Basilikum-Sorten mit Resistenz gegen FM in Form von sogenannten „Near Isogenic Lines“ (NILs). Die Erstellung von NILs ist ein Verfahren zur Introgression einzelner Merkmale z.B. von Wildtypen (Donor-Elter) in eine Kultursorte (Referenz- oder rekurrenter Elter) (Stam und Zeven, 1981), das sich zudem hervorragend zur nachfolgenden Identifizierung molekularer Marker für das erwünschte Merkmal eignet (Hospital 2005, Semagn et al. 2010). Nach Kreuzung von Donor-Elter und rekurrentem Elter wird eine bestimmte Anzahl von Nachkommen über mehrere Generationen mit dem reference parent rückgekreuzt, wobei die einzelnen Linien getrennt geführt werden. Nach der gewünschten Anzahl von Rückkreuzungsgenerationen werden die Pflanzen abschließend geselbstet und die homozygoten Nachkommen selektiert. Diese entsprechen nun weitgehend dem rekurrenten Elter, enthalten aber jeweils einen kleinen Teil des Genoms des Donor-Elters, so dass dessen Genom nun in Form dieser kleinen Stücke (homozygot) verteilt über die einzelnen NILs eingebettet in das Genom des rekurrenten Elters vorliegt. Die NILs können aufgrund der Homozygotie unbegrenzt erhalten werden. NILs mit dem gewünschten Merkmal des Donor-Elters können umgehend in der Züchtung genutzt werden oder sind sogar ihrerseits bereits erwünschte Genotypen. Aktuelle Veröffentlichungen betreffen z. B. Tomate (Monforte und Tanksley 2000) oder Senf (Mithila et al. 2012).

Die Gesamtpopulation der NILs stellt eine Quelle vieler zusätzlicher möglicher Merkmalsdonoren für die praktische Züchtung dar. Zudem ist sie sehr gut als Kartierungspopulation geeignet und stellt daher eine exzellente Basis für die zukünftige Entwicklung markergestützter Züchtung dar. Entsprechend wurden NILs in unterschiedlichen Kulturpflanzen vielfach genutzt, um Resistenzen in Zuchtmaterial einzubringen und gleichzeitig molekulare Marker zu identifizieren. Die Entwicklung einer markergestützten Selektion ist insbesondere für Resistenzen wünschenswert, da eine Selektion aufgrund von Resistenztests sehr aufwendig ist und die Arbeit mit dem Pathogen im Zuchtbetrieb erfor-

dert. Beispiele für den Einsatz von NILs zur Erstellung und Charakterisierung von Genotypen mit Resistenz gegen den FM sind Salat (Paran et al. 1991) und Sonnenblume (Pankovic et al. 2007).

In der Pflanzenzüchtung gilt bezüglich des Sortenschutzes der sogenannte Züchtere vorbehalten, d.h. auch geschützte Sorten anderer Züchter dürfen in der eigenen Züchtung uneingeschränkt verwendet werden, sofern tatsächliche Züchtungsarbeit geleistet wird und die neue Sorte von den Ursprungsgenotypen deutlich unterscheidbar ist. Im Fall ausgeprägter Rückkreuzungsprogramme wie im vorliegenden Fall bei der Erstellung von NILs sind die NILs in Bezug auf den rekurrenten Elter als „im wesentlichen abgeleitet“ zu betrachten. Entsprechend wird als rekurrenter Elter ein Genoveser Typ von GHG-Saaten (Sortenschutzinhaber) verwendet.

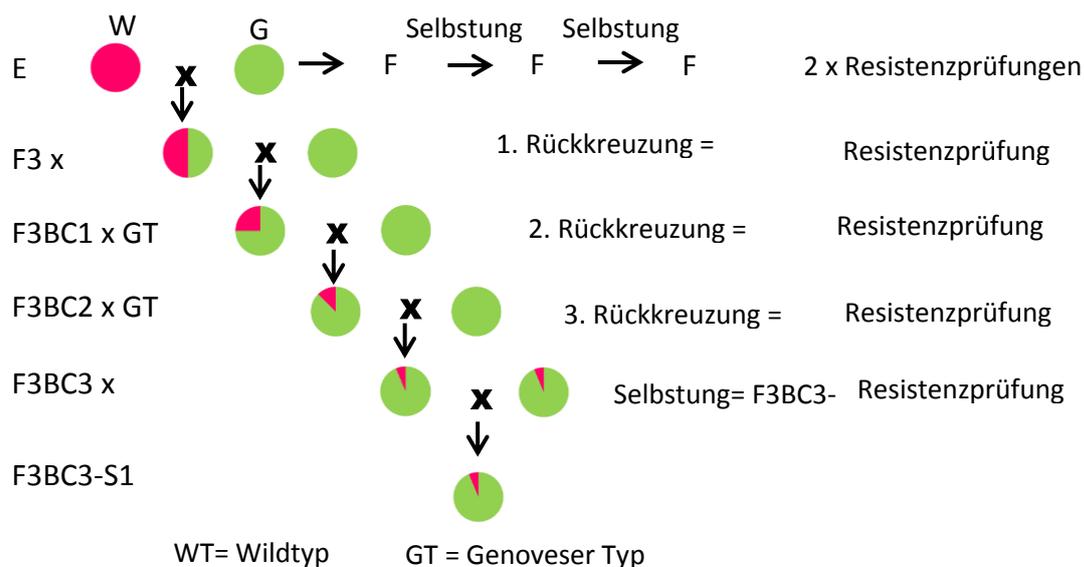
Die Bereitstellung einer gegen FM resistenten Basilikumsorte gewährleistet den Produzenten eine sichere und nachhaltige Produktion von Basilikum-Frischware mit geringeren Produktionskosten infolge der Vermeidung des Einsatzes von Blattfungiziden. Dem Verbraucher kann somit Basilikum ohne die Notwendigkeit des Einsatzes von Fungiziden angeboten werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Teil-Projekt IGZ (2812NA045)

##### 3.1.1 Erstellung und Charakterisierung einer Population von NILs von Basilikum und Selektion von Linien mit Resistenz gegen den FM

Die Arbeiten zur Erstellung der NILS Population bauten sich aus einer abwechselnden Abfolge von Kreuzungen/Rückkreuzungen bzw. Selbstungen sowie Resistenzprüfungen auf, wobei zunächst mit



**Abb. 2:** Schema der durchgeführten Kreuzungen und Rückkreuzungen zur Introgression der FM Resistenz in den Genoveser Typ

der Prüfung des Ausgangsmaterials auf Resistenz gegenüber FM begonnen wurde. Die Vorgehensweise der Rückkreuzung/Resistenzprüfung ist in Tab. 1 und in Abb. 2 schematisch dargestellt und im Ergebnissteil (4.1.1) genauer beschrieben.

**Tabelle 1:** Entwicklung von NILs auf Grundlage von Resistenzprüfungen und Kreuzungen (GHG Saaten GmbH/IGZ)

Jahr	Generation	
2008	Kreuzung BAVIRES & BARONESS x ‚Heiliges Basilikum‘ und ‚Apfelbasilikum‘	Basilikum-Projekt (I)
2009	F1, Selbstung intermediärer Pflanzen	
2010/11	F2, Resistenzprüfung in Großbeeren => resistente Pflanzen	
2012	F2, Selbstung der resistenten Pflanzen => F3	
2013	F2 x BAVIRES => F2BC1	
2014	F2 BC1 (1.Ausgangsmaterial) => Resistenzprüfung => alle anfällig	Basilikum NILs Projekt (II)
2014	F3 (2. Ausgangsmaterial) => Resistenzprüfung => 37, 58, 61, 77a, 77b, 88, 90 nicht anfällig	
2014/15	F3 BC1 = (‘Apfelbasilikum‘ x BARONESS) x BARONESS => Resistenzprüfung => 58M1, 58M2, 58M3, 58M4	
2015	F3BC2 (58M2) => Resistenzprüfung => einige Pflanzen wenig anfällig	
2016	F3BC3 => Resistenzprüfung=> einige Pflanzen wenig anfällig	
2017	F3BC3-S1 => Resistenzprüfung => einige Pflanzen wenig anfällig	
2018	F3BC3-S1=> Kulturführungs-Versuch (praxisnah) => FM Befall an wenigen Pflanzen	

### 3.1.1.1 Kultivierung von Basilikum

Resistenzprüfungen: Basilikumkörner der jeweiligen zu prüfenden Generation wurden in Aussaat-Schalen (60er Platten), die mit Fruhstorfer Erde (Typ P) gefüllt waren, ausgesät. Die Kultivierung von Basilikumpflanzen erfolgte in allen Versuchen unter praxisnahen Anzuchtbedingungen (Tag-/Nachttemperatur von 23/18 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 60 und 70 %; von Oktober bis April: Zusatzbelichtung von insgesamt vier Stunden (Lampentyp: SON-T 400 W, Philips).

Kreuzungen: Basilikumkörner wurden zunächst in Aussaat-schalen ausgesät und im Gewächshaus aufgestellt (Kultivierungsbedingungen siehe oben). Im 2-Blatt-Stadiums wurden je eine Pflanzen in einen Topf (Ø 8cm) gepflanzt. Ab Beginn des 6-Blatt-Stadiums wurden die Pflanzen in 5 Liter Töpfe umgetopft (Substrat: Fruhstorfer Erde mit Kokosfaser und Perlite gemischt) und nach dem Auftreten

der ersten Blüten, ca. acht bis zehn Wochen nach der Aussaat (abhängig von Jahreszeit), mittels Tonkin-Stäben stabilisiert. Die Kulturdauer, von der Aussaat bis zur Samenreife, betrug ca. 14-18 Wochen. Die Bewässerung der Pflanzen erfolgte über Tröpfchenbewässerung. Gedüngt wurde nach Bedarf mit „Hakaphos blau“ und „Hakaphos spezial“. Insgesamt wurde während der Kultur eine Düngemenge von 6 g der angegebenen Dünger appliziert.

### **3.1.1.2 Bestäubungsarbeiten für Kreuzungen und Selbstungen**

Alle Kreuzungen wurden an ausgewachsenen Basilikum-Pflanzen mit mehreren Seitentrieben durchgeführt, um eine möglichst hohe Saatguternte zu erreichen. Vor Beginn der Bestäubungsarbeiten wurden alle alten Blütentriebe entfernt, neue Blütentriebe mit Knospen an der Pflanze belassen und bereits aufgeblühte Blüten abgeknipst. Blütentriebe wurden anschließend in einen Crispac-Beutel eingetütet und mit Bindedraht verschlossen, um eine Fremdbestäubung zu vermeiden. Sobald die Blüten aufblühten, wurde der Crispac-Beutel vorsichtig entfernt und alle Blüten, deren Narbe frei von Pollen (von der eigenen Blüte) waren, per Hand bestäubt (Erfassung der Stamina mit Pinzette und Tupfen reifer Pollen auf die Narbe) und anschließend wieder eingetütet und mit einem Klebe-Ring-Etikett markiert. Diejenigen Blüten, die vor der Bestäubung bereits schon Pollen auf ihrer Narbe aufwiesen, wurden entfernt (Beurteilung mittels Lupe). Nach Erreichen der notwendigen Anzahl bestäubter Blüten an einer Pflanze, wurden die übrigen Knospen am Bestäubungstrieb, der Blütentrieb oberhalb der bestäubten Blüten (zur Vermeidung eines weiteren Wachstums/Knospenbildung) sowie alle nicht-bestäubten Blütentriebe entfernt. Bis zur Samenreife wurden neue Triebe regelmäßig eingekürzt, um die Ausbildung der Samen zu fördern. Die Bewässerung der Pflanze, auf der die Samen abreifen, wurde etwas eingeschränkt.

An der gleichen Pflanze wurden sowohl Selbstungen als auch Kreuzungen vorgenommen. Die eingetüteten Triebe wurden entweder in „Selbstungs-Trieb“ oder „Kreuzungs-Trieb“ unterteilt und mit einem Etikett entsprechend gekennzeichnet. Bestäubt wurden die Haupttriebe und die Seitentriebe 1. Ordnung und die Seitentriebe der 2. Ordnung wurden abgeschnitten. Die Bestäubungsarbeiten erfolgten wenige Monate nach der Aussaat und die Samenernte ab ca. 8 Wochen nach Bestäubung der Blüte.

### **3.1.1.3 Vermehrung von Klonen**

Die Vermehrung von Klonen diente in erster Linie der Erhöhung des Bestandes an Mutterpflanzen, um die Vermehrung zu befördern. Außerdem sollten diejenigen Nachkommen, die sich nach den Resistenzprüfungen als weniger anfällig erwiesen, vegetativ vermehrt werden, um die Pflanzen nochmals auf Resistenz gegen FM zu prüfen.

Von den Sämlingen, die geklont werden sollten, wurde zunächst ein Mutterpflanzenbestand aufgebaut, um eine größere Anzahl an Stecklingen von einem Genotyp zur gleichen Zeit entnehmen zu können. Triebspitzen (15 Stück pro Genotyp) wurden zu einem Zeitpunkt von den Mutterpflanzen entnommen und die Stecklinge in Steckmasse bewurzelt. Nach 10-14 Tagen wurden fünf gut bewurzelte Stecklinge in 8er-Töpfe in Substrat getopft (feines Tonsubstrat ohne Kokosfaser). Nach ca. drei Wochen wurden die Stecklinge in 5-Liter-Container in neues Substrat (Tonsubstrat mit Kokosfaser und Perlite) umgetopft. Sobald die Mutterpflanzen wiederum genügend Seitentriebe ausgebildet hatten, wurden an den Spitzen der Haupt- und Seitentriebe wiederum Stecklinge entnommen und vermehrt (30 Stück pro Genotyp).

### 3.1.1.4 Resistenzprüfung

Die Resistenzprüfungen erfolgten unter kontrollierten Bedingungen in einer Klimakammer. Als Referenz wurden die anfällige Genoveser Sorte BAVIRES bzw. BARONESS und die als nicht anfällig eingestuften Wildtypen ‚Apfelbasilikum‘ und ‚Heiliges Basilikum‘, dessen Saatgut aus dem kommerziellen Angebot von Saatgutfirmen stammte (2007) und bei GHG Saaten Aschersleben durch Selbstungen vermehrt worden war, in die Resistenzprüfungen einbezogen.

Herstellung des Inokulums von *P. belbahrii*: Für die Resistenzprüfungen wurde das *P. belbahrii* - Isolat ZM13 verwendet, welches 2013 von Basilikum Sorte ‚Rudy‘ (Genoveser Typ) aus einem Praxisbetrieb isoliert worden war. Als obligater Parasit kann der FM Erreger nur auf lebender Pflanze vermehrt werden. Aus diesem Grund wurde das Inokulum von *P. belbahrii* regelmäßig auf Basilikumpflanzen der anfälligen Sorte ‚BAVIRES‘ und der robusteren Sorte ‚Eleonora‘ unter Gewächshausbedingungen hergestellt. Aufgrund des hohen Anspruchs an Inokula-Mengen für die Resistenzprüfungen, wurde die auf Pflanzen produzierten FM-Sporen auf Blattmaterial bei -20 °C eingefroren. Kurz vor Gebrauch des Inokulums wurde dieses aufgetaut und entsprechende Mengen an Sporenlösung für die Resistenzprüfungen hergestellt (Djalali Farahani-Kofoet et al. 2014).

Inokulation: Im Vier-Blatt-Stadium wurden die Pflanzen mit Sporenlösung ( $10^5$  Sporen/ml; ca. 5 mL pro Pflanze) tropfnass besprüht und in der Klimakammer kultiviert. Zur Begünstigung der Infektion von *P. belbahrii* wurden die Pflanzen für 20 Stunden bei 20 °C, 95-100 % relativer Luftfeuchte und Dunkelheit inkubiert. Hierfür wurden mit Wasser besprühte Inkubationshauben (rel. Luftfeuchtigkeit ca. 100%) verwendet. Nach der Inkubation wurden die inokulierten Pflanzen für ca. 14 Tage bei einem 12 h Tag- und Nachtwechsel und einer Tag-/Nachttemperatur von 23/18°C in Klimakammern (randomisiert verteilt) angeordnet.

Bonitur: Erfasst wurde der qualitative Grad der Anfälligkeit. Zehn Tage nach Inokulation des Erregers erfolgte die Bonitur der Befallshäufigkeit (BH) und der Befallsstärke (BS) der inokulierten ersten vier Laubblätter. Eine wiederholte Bonitur wurde 14 Tage nach Inokulation (dpi) vorgenommen.

Wurde keine Sporulation des Erregers an den Blättern beobachtet, wurden die Pflanzen nochmals inokuliert und nachfolgend erneut bonitiert. Die Ermittlung der BS erfolgte in Boniturklassen, die einer prozentual zum Blatt berechneten, befallenen Blattfläche (mit Sporangienrasen überzogene Fläche) entsprachen (Tab.2).

**Tabelle 2:** Boniturklassen zur Erfassung des FM an Basilikum

Boniturklassen	bef. Blattfläche [%]	Mittel [%]
1	0	0
2	< 0,1	0,05
3	< 5	2,45
4	< 10	7,5
5	< 30	20
6	< 60	45
7	< 90	75
8	> 90	95

### 3.1.1.5 Resistenzprüfung der Generationen gegenüber FM

Alle zu prüfenden Generationen: F2BC1; F3BC1; F3BC2, F3BC3 sowie deren Selbstungen (Abb.2 und Tab. 1) wurden entsprechend der Resistenzprüfmethode (3.1.2) geprüft.

### 3.1.1.6 Resistenzprüfung von geklonten Pflanzen gegenüber FM

Um den Einfluss des Pflanzenalters sowie der Temperatur auf den Befall von Basilikum mit FM zu prüfen, wurden acht als resistent eingestufte F3 Genotypen unter Einbeziehung der Referenzsorten BAVIRES und BARONESS vegetativ vermehrt. In die Prüfung wurden jeweils 20 Klone pro F3-Genotyp (acht) einbezogen und unter folgenden Bedingungen kultiviert: fünf Wochen alte Klone wurden bei (A) 23°C, (B) 18°C und (C) eine Woche alte Klone bei 23°C kultiviert. Der Befall mit FM wurde 10 dpi bonitiert.

Jeweils 20 Klone von vier als wenig anfällig eingestuften Nachkommen der F3BC1(58M1, 58M2, 58M3, 58M4) wurden einer erneuten Resistenzprüfung gegen FM unterzogen.

### 3.1.2 Sammlung von *P. belbahrii*-Isolaten aus Saatgut und Praxisbetrieben und deren genotypische Charakterisierung mittels BOX-PCR

Bei der Selektion resistenter Genotypen von Basilikum gegenüber dem FM muss die genetische Variabilität des Pathogens berücksichtigt werden. Die Saatgutübertragbarkeit des Erregers und die Vermehrung von Basilikum in geographisch und klimatisch unterschiedlichen Regionen (z.B. Italien und

Indien) erhöht das Risiko des kontinuierlichen Eintrags genetisch diverser Isolate, die sich in ihren Virulenzeigenschaften unterscheiden können. Es wurde daher im Projektzeitraum eine Stammsammlung mit *Peronospora*-Isolaten aus den Vermehrungs- und Anbaugebieten angelegt und die Pathogenität geprüft (Tab. 3).

### 3.1.2.1 Pathogenitätsprüfung von *P. belbahrii* Isolaten

Die Pathogenität von Isolaten wurde unter kontrollierten Bedingungen an den Referenzsorten BAVIRES und ‚Eleonora‘ unter den für die Resistenzprüfung beschriebenen Bedingungen geprüft. Pro Sorte und Isolat wurden je 80 Pflanzen (20 Töpfe mit je vier Pflanzen pro Topf Ø 10 cm; Substrat: Fruhstorfer Erde Typ P) im 4-Blattstadium inokuliert und randomisiert in Klimakammern angeordnet. Inokulation, Kultivierung und Bonitur (8 und 14 dpi) erfolgten unter den entsprechend oben beschriebenen Bedingungen. Pro Versuch wurde die Pathogenität von fünf Isolaten unter Einbeziehung des Referenzisolates ZM13 geprüft. Die Pathogenität der Isolate wurde wiederholt geprüft.

**Tabelle 3:** Herkunft von *P. belbahrii* - Isolaten, isoliert vom Genoveser Basilikum-Typ

Nr.	Bezeichnung	Herkunft
1	PA14	Papenburger Raum 2014
2	ZM13	Münchner Raum, Bayern, 2013; Referenzisolat
3	RAJ13	Saatgut aus Indien 2013
4	BN16	Bonner Raum 2016
5	HD15	Heidelberger Raum 2015
6	HILD12	Italien 2012
7	MT3	Saatgut aus Indien 2007
8	MT4	Saatgut aus Indien 2007
9	LHM14	Bayern 2013
10	PRA13	Saatgut aus Indien 2013
11	DO16*	Dormagen 2016
12	Han14	Niedersachsen 2013

\*Isolat DO16 wurde nicht auf Virulenz geprüft

### 3.1.2.2 Charakterisierung der Genotypen mittels BOX-PCR

Die Charakterisierung des Genotyps der isolierten Isolate erfolgte mittels BOX-PCR. Dazu wurde die DNA von Sporenmaterial der Isolate extrahiert und die Fingerprints mittels des BOX-Primers BOXB1R (5'-CTAGGCAAGGCGACTGACG-3') charakterisiert. Dazu wurde das Sporenmaterial der

Isolate ( $10^4$  Sporen pro Probe) zweifach mit 0,35%igem NaCl gewaschen, zentrifugiert (5 min bei 4000g), der Überstand verworfen und ca. 100 mg für Extraktion eingewogen. Die Extraktion wurde nach Lee und Taylor (1990) durchgeführt. Die Probenverdünnung für die PR lag bei ca. 50ng/ $\mu$ l DNA. Der Reaktionsansatz betrug: PCR Super Mix: 21.5  $\mu$ l; Box B1R Primer: 2,5  $\mu$ l; DNA-Template (~50ng):1,0  $\mu$ l bei einem Probenvolumen von 25,0  $\mu$ l. Als Positivkontrolle (PK) diente *Rhizoctonia solani*. Die Elektrophorese erfolgte mit einem 1,5%igem Agarosegel, 0,5% TBE und Zugabe von Gel-Red ( Auftrennung: 25 min, 250 V); Probenvolumen: 25 $\mu$ l PCR Produkt; 3  $\mu$ l Auftragspuffer; Marker: 4  $\mu$ l 1Kb Ladder.

Temperaturprofil für Box PCR:

95 °C	94 °C	53 °C	65 °C	65 °C
6 min	1 min	1 min	8 min	16 min
35 Zyklen				

### 3.1.3 AFLP Fingerprinting bei *Ocimum basilicum* L.

Bei der Züchtung von Basilikum liegt ein besonderes Augenmerk auf der Homogenität, der Unterscheidbarkeit und der Beständigkeit einer Sorte. Mit Hilfe des AFLP-Fingerprints wurde die Homogenität von Pflanzenmaterial des Genoveser Typs untersucht. Mittels AFLP-Fingerprints wurde die genetische Variation unter Einbeziehung von sechs unterschiedlichen Wildformtypen („Out-Group“) erfasst. Des Weiteren wurde ein Sortenvergleich von 10 Basilikumsorten des Genoveser Typs durchgeführt (Seliger 2017).

Die im Versuch verwendeten Pflanzen wurden im Gewächshaus des IGZ angezogen (Tab.4). Für die Aussaat wurde das Profisubstrat, Vermehrungssubstrat Vliestopf (Weißtorf, Perlite) von Einheitserde verwendet. Zu zwei Terminen wurden Primärblätter bzw. Blattproben von den jüngsten Blättern entnommen und DNA für die Charakterisierung des Genotyps extrahiert.

DNA wurde jeweils aus 100 mg frischem Blattmaterial isoliert. Das frische Blattmaterial wurde direkt in der Kugelmühle Precellys 24 mit 6500 rpm aufbereitet. Die DNA-Isolierung erfolgte anschließend mit dem DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH) entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Für die DNA-Eluierung wurde eine Menge von 50  $\mu$ l destilliertem Wasser verwendet. Der DNA-Gehalt der einzelnen Proben wurde mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop 2000c bestimmt.

AFLP-Analyse: Vorarbeiten und Restriktion: Für den ersten Schritt musste von jeder Probe eine DNA-Menge von 150ng vorliegen. Die 150ng der genomischen DNA mussten anschließend mit 2,5 $\mu$ l 10x NEBuffer 2, 0,25 $\mu$ l 100X BSE, 5U *Hind*III-Restriktionsenzym, 3U *Mse*I-Restriktionsenzym und Wasser verdaut werden. Das Gesamtvolumen der Probe betrug 25 $\mu$ l. Die Reaktion benötigte eine Inkubationszeit von mindestens 12 Stunden bei 37°C. Der Verdau fand über Nacht statt.

Ligation der Adapter (2. Schritt des Protokolls): Es mussten zunächst die beiden Adaptermische für *HindIII* und *MseI* erstellt werden. Der *HindIII*-Adapter-Mix wurde erstellt aus 1:1:18, forward:reverse:H<sub>2</sub>O. Der *MseI*-Adapter-Mix aus 1:1, forward:reverse. Die Ligation der Adapter an die verdauten genomische DNA (gDNA) erfolgte mit 0,5µl *HindIII*-Adapter-Mix, 0,5µl *MseI*-Adapter-Mix, 0,5µl 10x Ligations-Puffer incl. ATP, 1U T4-DNA-Ligase und 3,45µl H<sub>2</sub>O. Die Probe musste anschließend für 4 Stunden bei 37°C inkubiert werden.

**Tabelle4:** Botanische Namen mit den entsprechenden Sorten verwendeter Pflanzen

Botanischer Name	Sortenname	Typ
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Apfelbasilikum‘	k.A.
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Balleta‘	Genoveser-Typ
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Bajazzo‘	Genoveser-Typ
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Baroness‘	Genoveser-Typ
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Basinova‘	Genoveser-Typ
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Bavires‘	Genoveser-Typ
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Edwina‘	Genoveser-Typ
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Eowyn‘	Genoveser-Typ
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Gecom‘	Genoveser-Typ
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Red Rubin‘	Genoveser-Typ
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Superbo‘	Genoveser-Typ
<i>Ocimum basilicum var. Thyrsiflora L.</i>	‘Thai-Basilikum‘	Wildformtyp/Out-Group
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Korsisches Basilikum‘	Wildformtyp/Out-Group
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Provence‘	Wildformtyp/Out-Group
<i>Ocimum basilicum L.</i>	‘Zanzibar‘	Wildformtyp/Out-Group
<i>Ocimum micranthemum L.</i>	‘Peruanisches Basilikum‘	Wildformtyp/Out-Group
<i>Ocimum tenuiflorum L.</i>	‘Tulsi‘	Wildformtyp/Out-Group

Pre-Amplifikation: Hierfür wurden 5µl der verdauten und ligierten DNA (DigLig DNA) benötigt. Zusammen mit 1,5µl *HindIII*+0, 1,5µl *MseI*+0, 5µl dNTP-Mix, 5µl 10X Puffer, green cap, 5U Taq-Polymerase und 31µl H<sub>2</sub>O wurde die DigLig DNA in einer PCR vervielfältigt. Mit der vorbereiteten Probe wurde eine PCR (Borchert und Gawenda, 2010) durchgeführt. Nachdem der verdauten, ligierten und pre-amplifizierten DNA (DigLig-Pre DNA; Gesamtvolumen von 50µl) 20µl entnommen wurden, mussten die verbleibenden 30µl der DigLig-Pre DNA 1: 20 mit Wasser verdünnt werden (30µl + 570µl).

Agarosegelelektrophorese: Mit den entnommenen 20µl DigLig-Pre DNA wurde die Reaktionskontrolle durchgeführt. Hierzu wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet. Das Gel wurde aus 5g Agarose-Pulver und 250ml 1x TAE-Puffer hergestellt.

End-Amplifikation und Polyacrylamidgelelektrophorese: Nach einem positiven Ergebnis der Gelelektrophorese mit dem Agarose-Gel, folgte gemäß dem Protokoll die End-Amplifikation. 2,5µl der zuvor verdünnten DigLig-Pre DNA wurden zusammen mit 2µl *Hind*III+XY IRDye Primer 1, 2µl *Hind*III+XY IRDye Primer 2, 0,3µl *Mse*I+XY Primer, 1µl dNTP-Mix, 1µl 10x Puffer green cap, 0,25U Taq-Polymerase und 1,15µl H<sub>2</sub>O vervielfältigt. Mit der vorbereiteten Probe wurde eine PCR (Borchert und Gawenda, 2010) durchgeführt.

Die Gelelektrophorese wurde mit einem Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Die Gelmatrix wurde hergestellt aus 20ml KB Plus Solution, 15µl TEMED und 150µl 10% APS. Die Elektrophorese wurde in dem DNA Sequencer von LI-COR und dem Programm SAGA lite durchgeführt. Die entstandenen Bilder der Gele wurden direkt im System abgespeichert und gemäß den Anleitungen für das Programm SAGA, in jenem ausgewertet.

Markerauswertung: Die für diesen Versuch ausgewerteten Bins wurden festgelegt in dem Programm SAGA der Firma LI-COR. Die Bedienung der Software erfolgte anhand des Handbuchs und des Tutorials. Die Bins dienen dazu die Marker in den Gelbildern festzulegen, um diese dann entsprechend der Versuchsfrage auszuwerten.

### **3.1.4 Regulierung der relativen Luftfeuchtigkeit im Bestand von Basilikum**

Ziel dieses AP war zu prüfen, ob durch die Reduzierung der Blattnässe und Blattnässedauer die epidemische Entwicklung des FM an Basilikum in der Topfkultur unter Gewächshausbedingungen signifikant reduziert werden kann. Dieses AP wurde nachträglich in das Projekt aufgenommen. Eine Reduzierung der Blattnässe und Blattnässedauer soll durch Erhöhung der Temperatur mittels Heizrohre, angeordnet über dem Bestand, erzielt werden. Am IGZ wurden dazu Gewächshauskabinen entsprechend ausgestattet.

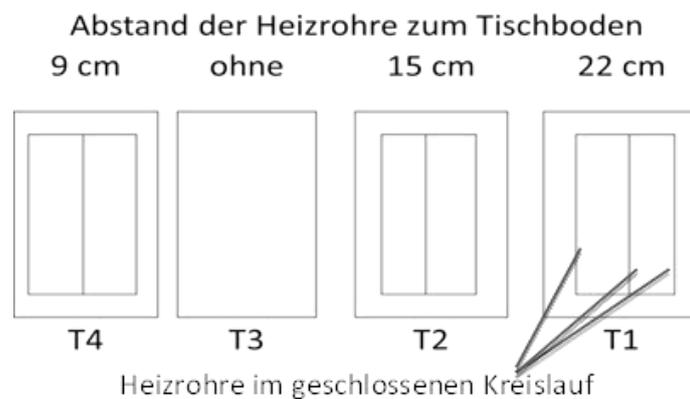
#### **3.1.4.1 Regulierung der Luftfeuchtigkeit in der Topfkultur im Bestand von Basilikum**

In mehreren Sätzen von Basilikum wurde im Vergleich zu einem Bestand ohne Wärmezufuhr die im Bestand gegebene relative Luftfeuchtigkeit (rF) bei einer Vorlauftemperatur von 40°C in den Heizungsrohren in Abhängigkeit von deren Abstand zum Bestand (ca. 9, 15 und 22 cm) bei derzeit üblicher Pflanzendichte und Anbaubedingungen in der Topfkultur im Gewächshaus bestimmt, um einen geeigneten Abstand der Heizrohre ohne negative Folgen für das Wachstum von Basilikum zu ermitteln. Mittels Temperatur- und Luftfeuchte-Sensoren (Firma „Galltec+mela“ Typ: KPC 1/5), die an

verschiedenen Stellen auf den Tischen und in unterschiedlichen Höhen im Bestand positioniert waren, wurde sowohl die Temperatur als auch die rF im Bestand erfasst (Abb.3 und 4)

Versuchsaufbau: Eine Gewächshauskabine (80 m<sup>2</sup>) wurde mit vier Tischen à 1x7,75 m ausgestattet, wobei auf drei Tischen Heizrohre installiert waren. Der Abstand der Heizrohre zum Tischboden betrug 22 cm bei Tisch 1(T1), 15 cm bei Tisch 2 (T2) und 9 cm bei Tisch 4 (T4). Tisch 3 (T3) wurde zur Kontrolle nicht mit Heizrohren ausgestattet. Die Vorlauftemperatur in den Rohren betrug 40°C. Pro Tisch wurde die rF und die Temperatur an drei unterschiedlichen Stellen und Höhen (0, 11 und 22 cm über der Topfoberkante) gemessen.

Basilikumkultur: In Töpfe (ø11 cm; Höhe: 8,5 cm), gefüllt mit Fruhstorfer Erde Typ P, wurden ca. 40-50 Basilikum-Körner der Sorte BAVIRES ausgesät und auf den Tischen platziert. Zur Förderung der Keimung wurde die Luftfeuchtigkeit in der Gewächshauskabine für die ersten sieben Tage auf ca. 90 % eingestellt. Die Temperatur während der Kultur betrug 23/18°C (Tag/Nacht). Der in der Gewächshauskabine eingebaute Energieschirm wurde nachts geschlossen und am Tage geöffnet bzw. wurde dieser bei hoher Sonneneinstrahlung zur Schattierung genutzt. Die Bewässerung der Pflanzen erfolgte über Schläuche auf dem Tisch (einmaliges Befüllen der Tische pro Tag). Ab dem Vier-Blatt-Stadium wurden die Pflanzen über das Bewässerungssystem gedüngt. Die Pflanzen wurden bis zu einer Höhe von ca. 25 cm kultiviert, wobei die Kulturdauer in Abhängigkeit von der Jahreszeit variierte.



**Abb. 3:** Versuchsaufbau in den Gewächshauskabinen zur Prüfung des Einflusses der Kulturführung auf die relative Luftfeuchtigkeit; Tischen ausgestattet mit Heizrohre (T1, T2, T4) und ohne Heizrohre (T3)



**Abb. 4:** Tisch mit Heizrohren im Bestand in der Gewächshauskabine

### **3.1.4.2 Prüfung der Krankheitsentwicklung in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit im Bestand von Basilikum**

Die Ergebnisse der fünf Versuche zur Ermittlung eines geeigneten Abstands der Heizrohre über dem Basilikumbestand zeigten, dass Heizrohre sowohl im Abstand von 9 cm (Höhe der Topfoberkante) als auch 15 cm über dem Tischboden (6 cm über der Topfoberkante) die niedrigste rF im Bestand gewährleistete.

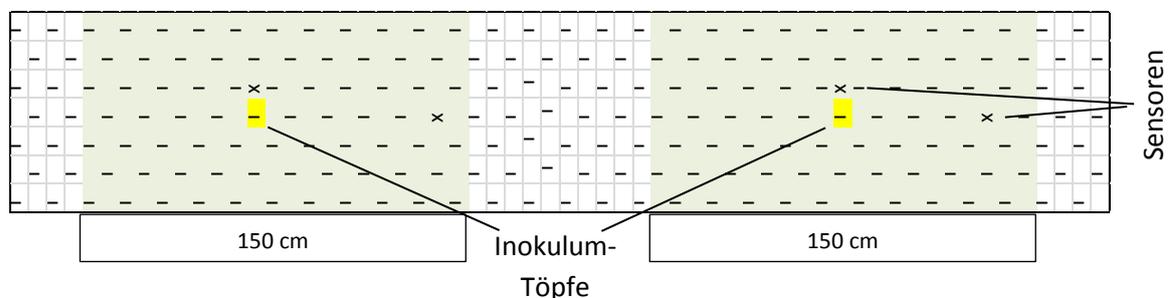
Die epidemiologische Entwicklung des FM im Bestand wurde daher in Abhängigkeit von der genannten Vorlauftemperatur (40°C) und bei einem Heizrohrabstand von 15 cm über dem Tischboden geprüft. Die Ausbringung des Erregers im Bestand (Basilikum im 4-Blattstadium) erfolgte mittels infizierter Pflanzen.

Zunächst wurden verschiedene Inokulum-Mengen ausgebracht und die epidemiologische Entwicklung bonitiert. In drei aufeinander folgenden Sätzen (Kultivierungsperioden) wurde im 4-Blattstadium von Basilikum drei Töpfe mit je drei infizierten Pflanzen an drei Positionen je Tisch ausgebracht und nachfolgend die BH auf jedem Tisch erfasst. Ein „Topf“ mit mindestens einer Pflanze, die eine Sporulation des FM Erregers aufwies, wurde bei allen Bonituren als befallen bewertet.

Im ersten Satz war bereits sechs Tage nach Ausbringung des Inokulums eine sehr rasche Ausbreitung des FM Erregers im Bestand zu beobachten. In der Kontrolle zeigte sich anfänglich eine schnellere epidemische Entwicklung des FM im Bestand im Vergleich zu den „beheizten“ Beständen. Diese Unterschiede waren jedoch 12 Tage nach dem Ausbringen des Inokulums nicht mehr gegeben. In einem weiteren Basilikum-Satz zeigte sich 10 Tage nach dem Ausbringen des Inokulums mit die höchste BH (68%, T3) im Kontrollbestand im Vergleich zu den „beheizten“ Beständen, die eine BH von 30% (T4) und 46,2% (T2) aufwiesen. Kaum Unterschiede in der Ausbreitung des Erregers im Bestand waren jedoch bei Vergleich der BH des beheizten T2 (46,9%) und T1 (46,2%) festzustellen. Im dritten Satz konnte 10 Tage nach dem Ausbringen des FM Inokulums auf keinem der Tische ein Befall mit FM festgestellt werden. Nach erneutem Ausbringen von FM Inokulum war fünf Tage nach Aus-

bringen des Inokulums ebenfalls nur eine geringe BH im Bestand gegeben. Der höchste Befall im Bestand war mit 14% BH in der Kontrollvariante (T3) zu beobachten, während durch die Reduzierung der rF eine BH von 4,3% (T2), 10,7 % (T1) und 11,1% (T4) gegeben war. Die Ergebnisse zeigten, dass die epidemische Entwicklung von *P. belbahrii* im Bestand von Basilikum durch Reduzierung der rF verzögert werden kann. Aufgrund der raschen Ausbreitung des Erregers im Bestand ist das eingesetzte Inokulum jedoch als zu hoch einzuschätzen (3 Positionen im Bestand).

Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen eine geringere Inokulum-Menge von zwei Töpfen mit jeweils einer mit dem FM Erreger sporulierenden Pflanze pro Topf auf jedem Tisch ausgebracht (Abb. 5). Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden mittels Sensoren im Bestand erfasst (Abb. 5). Als Kontrolle dienten Basilikum-Sätze in einer benachbarten Gewächshauskabine mit ebenfalls vier Tischen (à 1x7,75 m), die nicht mit Heizrohren ausgestattet waren. Zehn Tage nach Ausbringung des FM Inokulums wurde die BH im Bestand ermittelt.



**Abb. 5:** Schema der Ausbringung des FM Inokulums (gelb) auf zwei Flächen (ca. 150 cm) auf einem Tisch in der Gewächshauskabine mit jeweils zwei Luftfeuchtigkeit- und Temperatur-Sensoren (x)

### 3.1.4.3 Prüfung der Befallsentwicklung des FM während der Kultur der wenig anfälligen F3BC3-S1 unter praxisüblichen Bedingungen im Gewächshaus

Aus Selbstungslinien der letzten Rückkreuzung wurden die Samen von weniger anfälligen Basilikum-pflanzen geerntet, ausgesät, die Pflanzen im Vier-Blattstadium mit dem Erreger des FM inokuliert und ihre Anfälligkeit gegenüber dem FM bonitiert. Diese Pflanzen sind das Ergebnis von drei Rückkreuzungen und einer Selbstung (F3BC-S1). Aus den entsprechenden Rückkreuzungspopulationen wurden jeweils resistente bzw. wenig anfällige Pflanzen gegenüber dem FM selektiert, wobei die Anfälligkeit dieser Pflanzen unter praxisnahen Bedingungen erfasst wurde. Dabei wurde von den 84 ertragreichsten Pflanzen der F3BC-S1 je 5 x 30 Körner für den Kulturführungsversuch bezüglich der Regulierung der relativen Luftfeuchtigkeit verwendet. Diese stammten von 15 Klonen und umfassten von einer bis zu zehn Pflanzen. Hierfür wurden jeweils 5 x 30 Körner aus einer Linie in Töpfen ausgesät und auf den fünf Tischen in den beiden Gewächshauskabinen zusammen mit Töpfen, die mit BAVIRES aus-

gesät waren (84 F3BC3-S1 Pflanzen und 116 BAVIRES), randomisiert verteilt aufgestellt. Alle anderen Bedingungen entsprachen dem obigen Versuch.

## **3.2 Teil-Projekt GHG (2812NA115)**

### **3.2.1 Erstellung und Charakterisierung einer NILs Population von Basilikum - GHG**

Die Sorte BAVIRES (Genoveser Typ) mit dem als Resistenzträger identifizierten Wildtyp ‚Heiliges Basilikum‘ (und weiteren Resistenzträgern) gekreuzt worden. Letzterer unterscheidet sich von den als Küchenkräutern verwendeten Genoveser Typen in zahlreichen Merkmalen und ist in seiner ursprünglichen Form für den Markt ungeeignet. Die intermediären Pflanzen der F1-Nachkommenschaften wurden – als Indiz für gelungene Kreuzungen – geselbstet. Die F2-Nachkommenschaften wurden nachfolgend auf Resistenz gegen den FM getestet. Die resistenten Pflanzen wurden geselbstet und die daraus entstandenen F3-Pflanzen erstmals mit BAVIRES rückgekreuzt (F2BC1). Die daraus entstandenen Rückkreuzungspflanzen wurden erneut mit BAVIRES rückgekreuzt.

Von diesen Rückkreuzungen (F2BC2) wurden 90 zufällig ausgewählt und je 10 Kreuzungskörner - soweit vorhanden, ansonsten weniger - im ersten Projektjahr (2014) ausgesät, um jeweils drei Pflanzen für die weitere Bearbeitung zu erhalten. Diese wurden in Fünf-Liter-Töpfe gepflanzt und im Gewächshaus auf Tischen unter insektendichten Netzen aufgestellt. Als Pflanzenerde diente Substrat 2 von Klasmann. Stabilisiert wurden die Pflanzen mittels Tonkinstäbe. Jede Pflanze wurde mit BAVIRES rückgekreuzt und auch geselbstet. Die Bestäubung erfolgte unmittelbar nach der Kastration. Die Triebspitze oberhalb der bestäubten Kreuzungsblüten wurde abgeknipst.

Bei allen Pflanzen wurden individuell die Merkmale Blühbeginn, Blütenfarbe, Pflanzentyp und Geruch - in den Jahren 2015 und 2016 zusätzlich die Pflanzenlänge - erfasst. Zur Feststellung des Geruchs wurden ein oder zwei Blätter einer Pflanze zwischen den Fingern gerieben und der auf der Haut entstandene Geruch identifiziert. Die Pflanzenlänge wurde bei Blühbeginn von der Substratoberfläche im Pflanzgefäß bis zur Spitze des Haupttriebes gemessen. Die Ernte erfolgte einzelpflanzenweise, jeweils Kreuzungen und Selbstungen getrennt. Die Körner wurden von Hand ausgedroschen und gezählt bzw. gewogen.

Ziel der nachfolgenden Rückkreuzungen war ebenfalls 90 zufällige NILs zu erhalten. Weitergeführt wurden nur die Kreuzungskörner. Die Auswahl richtete sich nach der Zahl der geernteten Kreuzungskörner, um die 3 Kreuzungen/NIL mit der höchste Zahl an Körner zu selektieren. Die Selbstungen wurden in das Züchtungsprogramm der GHG Saaten aufgenommen, sofern sie von Typ und Geruch dem Genoveser Typ entsprachen (Tab. 5).

**Tabelle 5:** Entwicklung zufällige NILs - Generationsfolge (GHG Saaten GmbH)

<u>Jahr</u>	<u>Generation</u>
2008	Kreuzung BAVIRES x Heiliges Basilikum
2009	F1, Selbstung der intermediären Pflanzen
2010/2011	F2, Resistenzprüfung (IGZ) + Selbstung der resistenten Pflanzen
2012	BC 1 (F3-Pflanzen aus Saatgut der resistenten F2-Pflanzen x BAVIRES)
2013	BC 2 (x BAVIRES)
2014	BC 3 (x BAVIRES)
2015	BC 4 (x BAVIRES)
2016	BC 5 (x BAVIRES)

Zusätzliche Arbeiten im Rahmen der Projektverlängerung im Jahr 2017: Im Januar 2017 wurden 22 Pflanzen vom IGZ übernommen, die aus den am IGZ durchgeführten Rückkreuzungen stammten und sich als weniger anfällig gegenüber dem FM erwiesen. Diese wurden von der GHG Saaten GmbH in Gewebekultur übernommen. Hierzu wurden Triebspitzen (mit einem Blattpaar) von den Seitentrieben abgeschnitten und nach Sterilisation auf Murashige & Skoog-Medium (+7 g Plant Agar und 30 g D(+)-Saccharose; Duchefa Biochemie) bei 24,5°C im Klimaraum kultiviert. Nach erfolgter Seitentriebbildung wurden die Gewebekulturpflanzen jeweils weiter geteilt bzw. vermehrt. Die Gewebekulturpflanzen wurden jeweils nach 4 Wochen auf neues Nährmedium umgesetzt. Vor dem Aufsetzen der Steckling auf das sterile Kulturmedium wurden diese sterilisiert (2 % NaOCl; 10 min). Die gesamte Lösung wurde in einem Becherglas mit Magnetrührer verrührt, während die Basilikum-Nodien hinzugefügt wurden. Zum Aufsetzen auf das Nährmedium wurden die Triebenden bis auf ca. 5 cm gestutzt, Triebe mit Nodien ins sterile Nährmedium gesetzt und luftdicht verschlossen. Verwendet wurden durchsichtige Plastikschaalen (8 cm Höhe) mit Deckel. Diese wurden dann in einen Kulturraum bei 24,5°C und Licht (16 Stunden) inkubiert. Zum Überführen der Pflanzen in Erde wurden die in-vitro-Pflanzen samt ihren Wurzeln vorsichtig vom Agar befreit und in Substrat getopft.

## **4. Ergebnis**

### **4.1. Teil-Projekt IGZ (2812NA045)**

#### **4.1.1 Erstellung einer Population von NILs von Basilikum und Selektion von Linien mit Resistenz gegen den FM**

Am IGZ wurden nach der Resistenzprüfung des Ausgangsmaterials (F2BC1 und F3) drei Rückkreuzungen mit dem Genoveser Typ sowie eine abschließende Selbstung einschließlich Resistenzprüfungen durchgeführt (Abb. 2).

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus den Resistenzprüfungen sowie Rückkreuzungen der Basilikum-Generationen dargestellt:

- Resistenzprüfung des ausgewählten Ausgangsmaterials F2BC1. Es wurden insgesamt 1785 Pflanzen aus 50 Kreuzungslinien auf Resistenz gegenüber dem FM geprüft. Dieses Material erwies sich als anfällig gegenüber dem FM und wurde daher verworfen und auf das Ursprungsmaterial aus der Ernte der F2-Generation = F3 zurückgegriffen. Hierfür wurde resistentes F2-Zuchtmaterial, generiert aus Kreuzungen zwischen anfälligen Genoveser-Typ (cv. BAVIRES und BARONESS) und zweier resistenten Donor-Eltern (Wildtypen: ‚Apfelbasilikum‘ und ‚Heiliges Basilikum‘) bis zur Saatgutreife kultiviert und das Saatgut geerntet (F3 Generation). Die Resistenzprüfung zeigte, dass die als ursprünglich resistent eingestuften Wildtypen ‚Apfelbasilikum‘ und ‚Heiliges Basilikum‘ intermediär anfällig waren.
- Resistenzprüfung des zweiten Ausgangsmaterials = F3-Generation. Es wurden 50-100 Pflanzen aus 54 F3-Nachkommen ausgewählt (insgesamt 3059 Pflanzen) und auf Resistenz gegenüber dem FM geprüft. Im Ergebnis dieser Prüfungen erwiesen sich acht Genotypen aus der Rückkreuzungslinie BARONESS x ‚Apfelbasilikum‘ gegenüber dem FM als resistent (Nr. 37, 58, 61, 71, 77a, 77b, 88, 90). Diese acht F3-Nachkommen dienten als Ausgangsmaterial zur Erstellung von NILs. Auch in diesem Resistenztest erwies sich BARONESS als hoch anfällig und die mitgeführten Wildtypen ‚Apfelbasilikum‘ und ‚Heiliges Basilikum‘ als intermediär anfällig.
- Rückkreuzung 1. Die als resistent eingestuften acht F3-Genotypen wurden mit dem anfälligen Eltern-Genoveser-Typ (BAVIRES bzw. BARONESS) rückgekreuzt. An jedem F3-Genotyp wurden mindestens 150 Blüten kastriert und mit Pollen des entsprechenden Genoveser-Typ bestäubt. **Im Ergebnis dieser Rückkreuzungen entstand die F3BC1 Generation** (37M, 58M, 61M, 61M, 71M, 77aM, 77bM, 88M, 90M). Es wurden ebenfalls reziproke Kreuzungen durchgeführt: BAVIRES bzw. BARONESS dienten ebenfalls als Mutterpflanzen und wurden mit der F3-Generation als Pollenspender (Vaterpflanze) gekreuzt. Pro F3-Genotyp wurden 2-3 Genotypen, die dem Genoveser-Typ entsprechen, ausgewählt, ihre Blüten kastriert und mit Pollen des F3-Genotyps bestäubt (max. ca. 100 Blüten pro Pflanze). Als Ergebnis dieser Rückkreuzungen entstand die F3BC1 Generation (37V, 58V, 61V, 61V, 71V, 77aV, 77bV, 88V, 90V), die bis zur Samenreife kultiviert wurde, um die Samen zu ernten.
- Resistenzprüfung der F3BC1-Nachkommen 37M, 58M, 61M, 61M, 71M, 77aM, 77bM, 88M, 90M und 37V, 58V, 61V, 61V, 71V, 77aV, 77bV, 88V und 90V. Körner der F3BC1-Nachkommen wurden ausgesät und die Pflanzen auf Resistenz gegenüber FM geprüft. Es wurden jeweils 100 Körner der Mutterlinie und ca. 50 Körner der Vaterlinien, insgesamt 3200 Pflanzen, auf Resistenz gegenüber dem FM geprüft. Im Ergebnis erwiesen sich vier Einzelpflanzen der F3BC158M (58M1, 58M2, 58M3 und 58M4) als resistent bzw. sehr gering anfällig gegenüber dem FM (Tab. 6). Diese Pflanzen ähnelten vom Aussehen her mehr der Wildform.

- Rückkreuzung 2. Diese vier wenig anfälligen Pflanzen 58M1, 58M2, 58M3 und 58M4 der F3BC1-Nachkommen wurden zunächst vegetativ vermehrt und anschließend mit BARONESS rückgekreuzt (auch reziproke Kreuzungen). **Im Ergebnis dieser Rückkreuzungen entstand die F3BC2-Generation.**

**Tabelle 6:** Geprüfte Genotypen der F3BC1 auf Resistenz gegenüber dem FM

Genotyp	N	Kreuzung	Auf-	BS [%]	BH [%]
37 M	100	V = BAVIRES	77	76,3	100,0
37 V1	50	M = BAVIRES	45	80,3	100,0
37 V2	50	M = BAVIRES	41	77,4	100,0
58 M	100	V= BARONESS	77	54,9	87,0
58 V1	33	M = BARONESS	29	65,8	100,0
58 V2	33	M = BARONESS	27	76,6	100,0
58 V3	34	M = BARONESS	21	77,7	100,0
61 M	100	V = BAVIRES	23	79,4	100,0
61 V1	50	M = BAVIRES	42	79,9	100,0
61 V2	50	M = BAVIRES	30	79,9	100,0
71 M	100	V = BAVIRES	78	85,1	98,7
71 V1	50	M = BAVIRES	52	83,1	100,0
71 V2	50	M = BAVIRES	33	84,0	100,0
77a M	77	V = BAVIRES	38	66,1	100,0
77a V1	65	M = BAVIRES	51	86,5	100,0
77a V2	61	M = BAVIRES	58	82,4	100,0
77b M	100	V= BAVIRES	59	78,8	100,0
77b V1	50	M = BAVIRES	48	80,6	100,0
77b V2	50	M = BAVIRES	42	85,2	100,0
88 M	100	V = BAVIRES	76	73,4	100,0
88 V1	33	M = BAVIRES	28	80,8	100,0
88 V2	33	M = BAVIRES	30	82,8	100,0
88 V3	34	M = BAVIRES	24	77,5	100,0
90 M	100	V = BAVIRES	43	66,9	100,0
90 V1	50	M = BAVIRES	47	83,0	100,0
90 V2	50	M = BAVIRES	43	83,7	100,0
BAVIRES	100		88	83,1	100,0
Tulsi*	50		12	0	0
Apfelbasil.	50		47	61,2	99,0

\* Tulsi (= ‚Heiliges Basilikum‘) neuer Zukauf von herkömmlichen Samenfirma (2015)

- Resistenzprüfung der F3BC2-Nachkommen 58M1, 58M2, 58M3 und 58M4. Es wurden in zwei aufeinanderfolgenden Resistenztests (1 und 2) Pflanzen der F3BC2-Nachkommen 58M1, 58M2, 58M3 und 58M4 auf Anfälligkeit gegenüber FM geprüft. Eine Vielzahl der geprüften Pflanzen erwies sich als stark anfällig. Einige Pflanzen zeigten jedoch einen geringen Befall gegenüber dem FM. Von den Selbstungskörner zeigte die Nachkommenschaft 58M2 eine geringe Anfälligkeit (Tab. 7).

**Tabelle 7:** Befallshäufigkeit und Befallsstärke der geprüften F3BC2-Nachkommen 58M1, 58M2, 58M3, 58M4

geprüfte Pflanzen	Resistenztest 1			Resistenztest 2		
	N	BS [%]	BH [%]	N	BS [%]	BH [%]
BARONESS	172	92,9	100	82	86,0	100
Apfelbasilikum	174	48,2	100	146	30,2	99
58 M1 (F3BC2)	175	59,9	99	81	46,0	98
58 M2 (F3BC2)	165	31,2	92	36	19,1	83
58 M3 (F3BC2)	178	29,8	81	56	15,4	89
58 M4 (F3BC2)	151	63,7	98	45	58,9	96
58 M1 (F3BC1- S1)	21	17,0	86			
58 M2 (F3BC1- S1)	10	5,6	40			
58 M3 (F3BC1- S1)	1	7,5	100			
58 M4 (F3BC1- S1)	72	38,2	94			

- Rückkreuzung 3. Die Pflanzen der F3BC2-Nachkommenschaft 58M1, 58M2, 58M3 und 58M4 mit der geringsten Anfälligkeit gegenüber FM wurden ein drittes (letztes) Mal mit der Sorte BARONESS rückgekreuzt und bis zur Samenreife kultiviert. **Im Ergebnis dieser Rückkreuzungen entstand die F3BC3-Generation.**
- Resistenzprüfung der F3BC3-Nachkommen 58M1, 58M2, 58M3 und 58M4. Es wurden in drei aufeinanderfolgenden Resistenztests ca. 3000 Pflanzen geprüft. Unter der F3BC3-Nachkommenschaft war der Großteil der geprüften Pflanzen stark anfällig. Eine geringe Anzahl an Pflanzen (Nr. 1-13, Tab. 8), die mehr der Wildform ähnelten, zeigten eine geringe Anfälligkeit (BS < als 10%). Auf Wunsch des Züchters wurden auch einige Pflanzen selektiert, die eine BS bis 30% aufwiesen (Nr. 14-22, Tab.8), da bei diesen Pflanzen die Merkmale mehr dem Genoveser Typ gleichen (Tab.8).
- Selbstung der F3BC3 Nachkommen. Die nach der 3. Rückkreuzung selektierten gering anfälligen Einzelpflanzen (1-22, Tab.8) wurden über Gewebekultur (GHG Saaten) vegetativ vermehrt und bis zur Samenreife kultiviert. **Im Ergebnis dieser Selbstung entstand die F3BC3-S1 Generation.**
- Resistenzprüfung der F3BC3-S1 Nachkommen. Die Stabilität der Resistenz gegenüber FM an den Pflanzen aus den geeernteten Körnern der F3BC3-S1 wurde wiederholt geprüft. Dazu wurden in zwei Resistenztests je 18 Körner (insgesamt 3200 Pflanzen) von aus vorherigen Resistenzprüfungen ausgesuchten und geselbsteten wenig anfälligen Pflanzen geprüft. Etwa 140 Pflanzen zeigten keinen oder nur einen geringen Befall. Diejenigen nicht bzw. wenig anfälligen Pflanzen, die den Merkmalen des Genoveser Typs am stärksten entsprachen, wurden ausgesucht und als Zuchtmaterial für Basilikum mit eingekreuzter ‚Resistenz‘ der GHG zur Verfügung gestellt. Einige der wenig

anfälligen Pflanzen, die nach der Selbstung ausreichend Körner ausbildeten, wurden noch in einem praxisnahen Kulturführungsversuch (mit und ohne Regulierung der Luftfeuchtigkeit) auf ihre Resistenz gegenüber dem FM untersucht (siehe 4.1.4.3.)

**Tabelle 8:** Selektierte Pflanzen (gering anfällig) der F3BC3-Nachkommenschaft 58M1, 58M2, 58M3 und 58M4

Nr.	geprüfte Pflanzen	BS [%]	BH [%]
1	58M2/16-8	1.7	100
2	58M2/6-1	1.9	100
3	58M4/1-2	2.5	100
4	58M2/16-5	4.6	100
5	58M4/1-5	5.0	100
6	58M4/1r-5	5.6	100
7	58M4/1-18	5.6	100
8	58M4/1-19	5.6	100
9	58M2/15-8	5.8	100
10	58M2/16-2	6.7	100
11	58M4/1-4	6.7	100
12	58M2/15-7	8.8	100
13	58M2/15-1	9.5	100
14	58M2/8-2	16.3	100
15	58M4/1-13	16.3	100
16	58M2/8-3	16.3	100
17	58M2/12-3	16.3	100
18	58M4/1-6	16.3	100
19	58M4/1-7	16.3	100
20	58M4/1-15	22.5	100
21	58M4/1-14	30.0	100
22	58M2/8-2	30.0	100

#### 4.1.1.1 Weitere im Verlauf des Projektes durchgeführte Resistenzprüfung an Pflanzen aus Selbstungen und Verklonungen

- Resistenzprüfung der F3-Selbstungskörner (F3-S1). Um Rückschlüsse auf die Vererbung der Resistenz von geselbsteten Nachkommen ziehen zu können, wurden die als nicht anfällig ausgewählten acht Genotypen (37, 58, 61, 71, 77a, 77b, 88, 90) der F3 Generation geselbstet. Sowohl die Samenentwicklung als auch die Keimfähigkeit der Selbstungs-Nachkommen war sehr schwach. Es wurden eine Pflanze der F3-S1/37, 39 Pflanzen der F3-S1/58, zwei Pflanzen der F3-S1/77 b und 38 Pflanzen der F3-S1/90 (69 Körner) auf Anfälligkeit gegenüber dem FM geprüft. Fast alle Pflan-

zen, die aus den F3-Selbstungen hervorgingen, waren stark anfällig. An zwei Pflanzen des Genotyps F3-S1/90 und drei Pflanzen des Genotyps F3-S1/58 wurde nach der ersten Inokulation kein Befall festgestellt werden. Diese wurden erneut inokuliert und bonitiert, wobei sich zwei Nachkommen der F3-S1/58 als leicht anfällig erwiesen.

- Resistenzprüfung von geklonten gering anfälligen Pflanzen der F3- und F3BC1-Nachkommenschaft. Der Genotyp 58 war 10 dpi im Mittel am wenigsten anfällig (Tab. 9). Die fünf Wochen alten Klone, die bei 23°C kultiviert wurden (Behandlung A), zeigten die geringste BS und BH im Vergleich zu den fünf Wochen alten Klonen, die bei 18°C (B), und eine Woche alten Klonen, die bei 23°C (C) kultiviert wurden (Tab.9 und 10). Nach 14 dpi zeigte sich ein Anstieg der BS.

**Tabelle 9:** Einfluss von Temperatur und Klon-Alter auf Anfälligkeit von F3-Genotypen 10 dpi

Genotyp	BS [%]			Mittel BS [%]	BH [%]			Mittel BH [%]
	A	B	C		A	B	C	
37	14.8	35.3	24.9	25.4	82	89	100	91.1
58	1.3	5.1	9.9	5.4	40	35	70	48.3
61	1.8	2.5	34.5	13.5	15	18	95	43.9
71	0.2	3.2	26.2	10.4	11	33	85	44.6
88	4.4	10.8	27.3	14.3	45	50	90	62.1
90	12.3	20.3	22.2	18.2	95	94	85	91.4
77a	0.9	7.1	13.3	7.1	35	44	70	98.3
77b	4.6	10.3	16.2	10.4	75	78	75	50.0
BAVIRES	77.6	93.3	93.6	84.7	95	100	100	75.9
BARONESS	75.6	88.8	89.8	88.0	100	100	100	100.0

**Tabelle 10:** Befallsstärke und Befallshäufigkeit bei verschiedenen Behandlungs/Kultivierungs-Varianten von F3-Genotypen 10 dpi

Behandlung	BS [%]	BH [%]
A	19.6	66
B	27.9	71
C	35.8	92

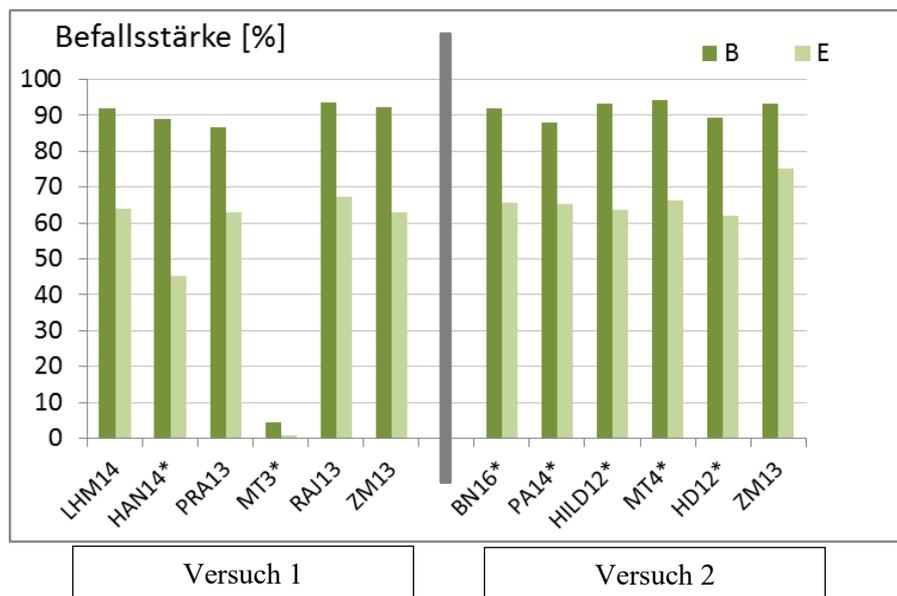
- Resistenzprüfung der Klone von 58M1, 58M2, 58M3 und 58M4 der F3BC1-Generation. Die Klone, die von 58M2 abstammten, zeigten 10 dpi die niedrigste BS und BH. Klone, die von 58M4 abstammten, zeigten eine hohe Anfälligkeit gegenüber dem FM (Tab. 11).

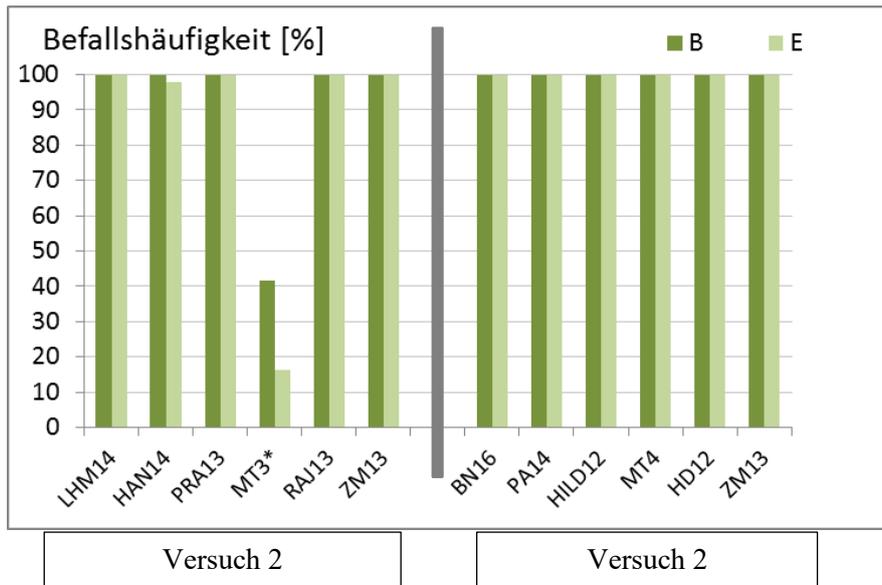
**Tabelle 11:** Befallsstärke und Befallshäufigkeit von vier Klonen der F3BC1-Generation 10 dpi

Klon	BS [%]	BH [%]
58M2	1.3	40
58M3	13.2	95
58M1	18.7	100
58M4	30.6	100
BARONESS	93.1	100

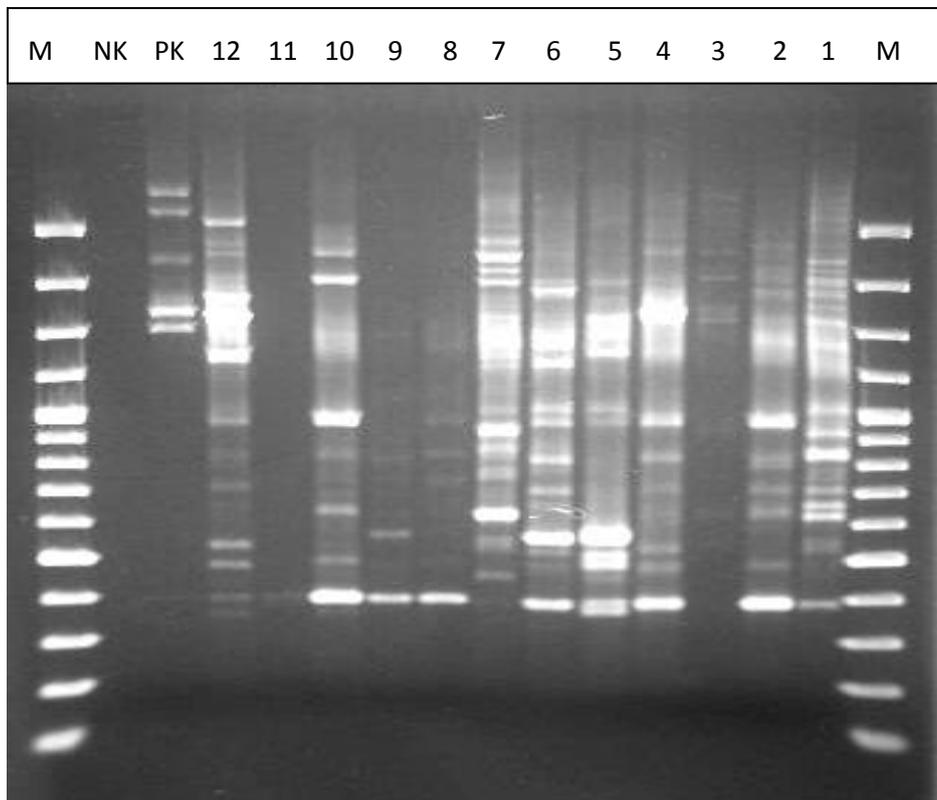
#### 4.1.2 Charakterisierung der Isolate und Prüfung der Anfälligkeit

Bis auf das Isolat MT3 erwiesen sich alle Isolate als pathogen und verursachten 12 dpi eine hohe BS und eine nahezu hundertprozentige BH an den Sorten BAVIRES und ‚Eleonora‘. BAVIRES reagierte mit deutlich höherem Befall im Vergleich zur Sorte ‚Eleonora‘ (Abb. 6). Die Ergebnisse der BOX-PCR zeigen, dass die Isolate in Gruppen mit vergleichbaren Fingerprints aufgeteilt werden können (Abb. 7). Eine ausreichende Vermehrung des Isolates 12 war nicht möglich, daher konnten keine Fingerprints generiert werden.





**Abb. 6:** Pathogenität von *P. belbahrii* Isolaten, getestet an den Basilikumsorten BAVIRES (B) und ‚Eleonora‘ €, anhand der BS und BH 12 dpi in Versuch 1 und 2; \*signifikant verschieden zum Referenzisolat ZM13 im jeweiligen Versuchsblock; zweiseitiger Dunnett-Test,  $p=0,05$ . Befallsstärke und Befallshäufigkeit



**Abb. 7:** BOX-PCR-Fingerprints von *P. belbahrii* Isolaten (1=PA14; 2=ZM13; 3=RAJ13; 4=BN16; 5=HD15; 6=HILD12; 7=MT3; 8=MT4; 9=LHM14; 10=PRA13; 11=DO16; 12=HAN14) PK: Positivkontrolle (*Rhizoctonia solani*); NK: Negativkontrolle; M: Marker (1kb)

### 4.1.3 AFLP Fingerprinting von Basilikum

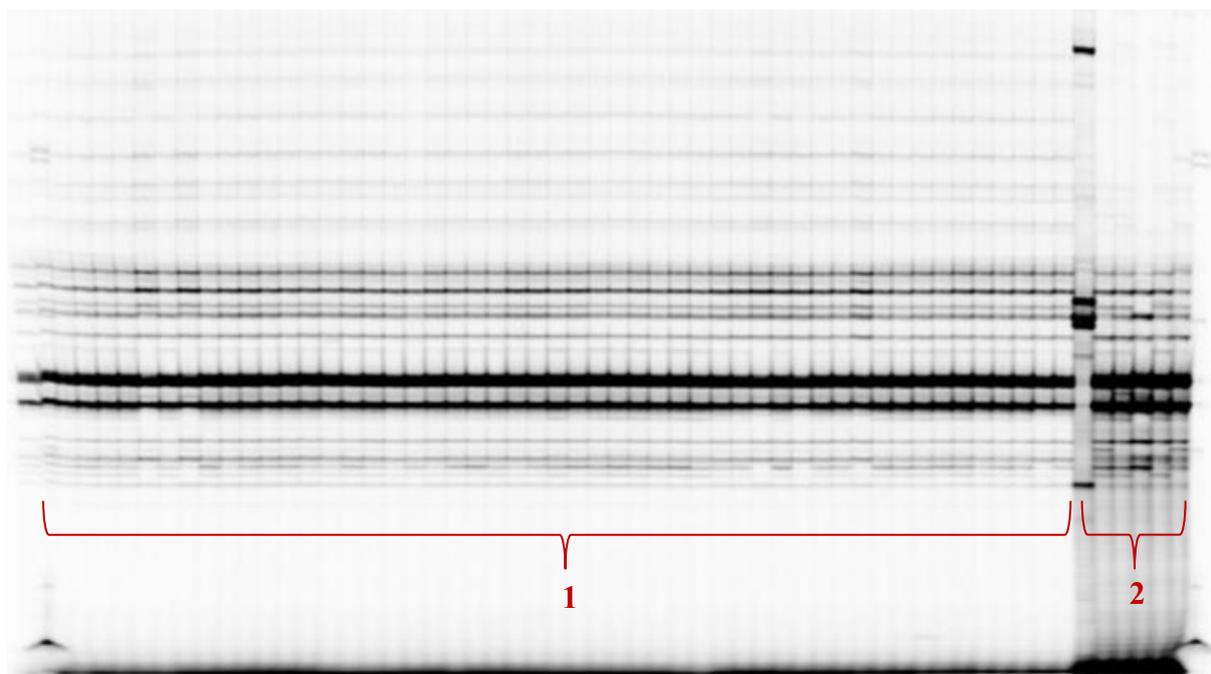
#### 4.1.3.1 Homogenität innerhalb der Liniensorten

Der Homogenitätstest sollte Aufschluss über die genetische Homogenität der untersuchten Sorten geben. In die Untersuchungen wurden die Basilikumsorten *O. basilicum* L. ‘Edwina‘, BAVIRES und ‘Gecom‘ einbezogen. Da es sich um Liniensorten handelt, ist davon auszugehen, dass sie weitgehend homogen sind. Es kann aber dennoch eine höhere Variabilität innerhalb einer solchen Liniensorte bestehen im Vergleich zu vegetativ vermehrten Klonsorten. Daher wurde die AFLP-Analyse der drei Sorten mit jeweils 50 Pflanzen durchgeführt, von denen je eine Blattprobe entnommen wurde. Als Out-Group wurden die Wildformen: *O. basilicum* var. *Thyrsiflora* L., *O. basilicum* L. ‘Korsisches Basilikum‘ und ‘Provence‘, sowie *O. micranthemum* L. und *O. tenuiflorum* L. ausgewählt (Tab.4), von denen je eine Probe pro Individuum untersucht wurde.

Es wurden mit acht Primerkombinationen (Tab.12) insgesamt 200 AFLP-Marker generiert. Dabei wurde eine AFLP-Bande als Marker gewertet, wenn ein Marker polymorph zwischen den Genoveser-Sorten oder zur Out-Group war.

**Tabelle 12:** Verwendete Primerkombinationen in den AFLP-Analysen

Nr.	Primer1	Primer2
1	<i>HindIII</i> +CGA	<i>MseI</i> +TAC
2	<i>HindIII</i> +AGT	<i>MseI</i> +TAC
3	<i>HindIII</i> +AAC	<i>MseI</i> +CTC
4	<i>HindIII</i> +ACT	<i>MseI</i> +CTC
5	<i>HindIII</i> +CGA	<i>MseI</i> +CTCT
6	<i>HindIII</i> +AGT	<i>MseI</i> +CTCT
7	<i>HindIII</i> +CGA	<i>MseI</i> +CGCG
8	<i>HindIII</i> +AGT	<i>MseI</i> +CGCG



**Abb. 8:** AFLP-Fingerprints von 50 BAVIRES-Proben (Klammer 1) und der sechs Sorten der Out-Group *O. tenuiflorum* L.; *O. basilicum* L. 'Zanzibar', *O. basilicum* var. *Thyriflora* L.; *O. micranthemum* L.; *O. basilicum* 'Provence'; *O. basilicum* L. 'Korsisches Basilikum'(Klammer 2).

Die AFLP-Fingerprints (Bins) wurden mit dem Programm SAGA ausgewertet. Die Fingerprints der Out-Group AFLP-Fingerprints weisen ein der Sorte entsprechendes spezifisches Bandenmuster auf (Abb. 8).

**Tabelle 13:** Bestimmung der Homogenität anhand von 200 AFLP-Markern (Bins)

Sorte	Pflanzen gesamt	Identisch (%)	Abweichend	Anzahl Genotypen
Gecom	50	43 (86,0)	7	4
Edwina	49	43 (87,8)	6	5
Bavires	49	29 (59,2)	20	16

Bei der Bestimmung der Homogenität der AFLP-Fingerprints wurden die 50 Fingerprints einer Sorte nach der Anzahl an identischen Proben und nicht identisch Fingerprints gruppiert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Gruppe, welche die größte Anzahl an identischen Genotypen beinhaltet (Hauptgruppe) dem Genotyp der Sorte entspricht. Bei 'Edwina' (43 von 49 Fingerprints) und 'Gecom' (43 von 50 Fingerprints) zeigten sich 88% bzw. 86% der auswertbaren Fingerprints als identisch. Bei der Sorte BAVIRES wiesen jedoch lediglich 29 der 49 Fingerprints ein identisches Bandenmuster auf (59,2%) (Tab.13). Bei der Sorte BAVIRES zeigten somit 20 Individuen ein abweichendes AFLP-

Bandenmuster und damit höhere genetische Heterogenität. In 'Gecom' wurden insgesamt vier unterschiedliche Genotypen (inklusive der Hauptgruppe) identifiziert, bei 'Edwina' fünf und bei BAVIRES 16. Der Grad der Abweichung der abweichenden Proben (Gecom: 7, Edwina: 6; BAVIRES: 20) ist anhand der Bins dargestellt (Tab. 14).

**Tabelle14:** Verteilung der polymorphen Marker unter den abweichenden Pflanzen

Sorte	analys. Bins	1 Bin	2 Bins	3 Bins	4 Bins	5 Bins	8 Bins
Gecom	200	6 Pfl.	1 Pfl.				
Edwina	200	4 Pfl.	2 Pfl.				
BAVIRES	200	9 Pfl.	7 Pfl.	1 Pfl.	1 Pfl.	1 Pfl.	1Pfl.

Die Anzahl der Bins, die sich von der Hauptgruppe unterscheiden, ist Ausdruck des Grad der Abweichung. So wichen bei 'Gecom' die sieben abweichenden Proben maximal um zwei Bins ab, wobei die Abweichung von zwei Bins nur in einem der 50 Individuen zu finden war. Bei den restlichen sechs abweichenden Proben handelte es sich jeweils um eine Abweichung von der Hauptgruppe von einem Bin. Bei 'Edwina' lag die maximale Abweichung der insgesamt sechs abweichenden Proben ebenfalls bei zwei Bins, die bei zwei der 49 Individuen auftraten. Die restlichen vier abweichenden Proben unterschieden sich in jeweils nur einem Bin von der Hauptgruppe.

Die größte Abweichung war mit acht Bins bei BAVIRES zu verzeichnen: eine der 49 Proben unterschied sich in acht Bins, neun unterschieden sich in einem Bin, sieben in zwei Bins und jeweils eine in drei, vier und fünf Bins. Die jeweiligen prozentualen Abweichungen innerhalb jeder Sorte weist Tab. 15 aus. Dabei entsprach die Hauptgruppe 100%, da sie den Genotyp der jeweiligen Sorte darstellte. So weist innerhalb der Sorte 'Gecom', die größte Abweichung mit 2 Bins (Tab.14 und 15) immer noch eine 99%-ige Übereinstimmung zur Hauptgruppe auf (1% Abweichung innerhalb der 50 Proben). Ebenfalls 1% maximale Abweichung wiesen die Individuen der Sorte 'Edwina' mit zwei Bins auf (Tab.14 und 15). Bei BAVIRES war eine maximale Abweichung von 4% gegeben. Hier lag dementsprechend noch eine Übereinstimmung von 96% zur Hauptgruppe vor.

#### 4.1.3.2 Sorten-Vergleich

Es wurde des Weiteren AFLP-Fingerprints von acht Sorten weiterer Genoveser-Sorten erstellt: *Ocimum basilicum* L. 'Balleta', 'Bajazzo', 'Baroness', 'Basinova', 'Eowyn', 'Gecom', 'Red Rubin' und 'Superbo'. Zum Vergleich wurden die Sorten BAVIRES und 'Edwina' sowie die genannten Out-Group in die Untersuchungen einbezogen. Von den zehn Genoveser-Sorten wurden jeweils drei Proben von drei verschiedenen Individuen entnommen. Ziel der Untersuchungen war, die genetische Va-

riation der Sorten im Vergleich zu 'Edwina' und BAVIRES zu analysieren. Die Auswertung erfolgte anhand von 200 AFLP-Markern generiert mittels 10 Primerkombinationen (Tab. 16).

**Tabelle 15:** Aufschlüsselung der abweichenden Proben innerhalb der Sorten mit Angabe der Abweichungen von Hauptgruppe (%) und maximalen Abweichung (%)

Sorte	Gesamt	100%	99%	98%	97%	96%	max. Abweichung
Gecom	50	43	7				1%
Edwina	49	43	6				1%
BAVIRES	49	29	16	2	1	1	4%

**Tabelle16:** Verwendete Primerkombinationen für den Sorten-Vergleich

Nr.	Primer 1	Primer 2
1	<i>HindIII+CGA</i>	<i>MseI+TAC</i>
2	<i>HindIII+AGT</i>	<i>MseI+TAC</i>
3	<i>HindIII+AAC</i>	<i>MseI+CTC</i>
4	<i>HindIII+ACT</i>	<i>MseI+CTC</i>
5	<i>HindIII+CGA</i>	<i>MseI+CTCT</i>
6	<i>HindIII+AGT</i>	<i>MseI+CTCT</i>
7	<i>HindIII+CGA</i>	<i>MseI+CGCG</i>
8	<i>HindIII+AGT</i>	<i>MseI+CGCG</i>
9	<i>HindIII+AAC</i>	<i>MseI+TCA</i>
10	<i>HindIII+ACT</i>	<i>MseI+TCA</i>

Die Bandenmuster von BAVIRES und ‚Edwina‘ weisen sehr ähnliche Muster auf. Die beiden Sorten ‚Edwina‘ und BAVIRES wiesen in acht der 200 untersuchten AFLP-Markern Unterschiede auf. Laut dem hier ausgewerteten Material betrug der genetische Unterschied zwischen den zu untersuchenden Sorten ‚Edwina‘ und BAVIRES also 4%. Somit scheinen nur geringe genetische Unterschiede zwischen den beiden Sorten zu bestehen.

Die Ergebnisse bestätigen die bereits festgestellte höhere Inhomogenität in den Bandenmustern von BAVIRES. Zwischen den Individuen der einzelnen Sorten waren ebenfalls Inhomogenitäten gegeben. Solange dabei nur eine der drei Proben im Genotyp von den anderen beiden abwich, wurden die beiden übereinstimmenden Genotypen als Hauptgruppe gewertet und zum Vergleich herangezogen.

**Tab.17:** Genetischer Unterschied zwischen den Genoveser-Sorten (GS) und Out-Group Arten (OG) [%] anhand von AFLP-Fingerprints

	Gruppe	Red Rubin	BAJAZZO	BARONESS	Eowyn	BALLETA	Gecom	Edwina	BAVIREN	BASINOVA
Red Rubin	GS	X								
BAJAZZO	GS	10	X							
BARONESS	GS	7,5	4,5	X						
Eowyn	GS	8	3	2,5	X					
BALLETA	GS	8	5	0,5	3,5	X				
Gecom	GS	11	6,5	7	7,5	8	X			
Edwina	GS	10	8	6	7	6	4,5	X		
BAVIREN	GS	8	4	3	2,5	3	6,5	4	X	
BASINOVA	GS	10	0,5	4,5	3	4,5	6,5	8	4	X
<i>O. tenuiflorum</i> Tulsi	OU	75,5	74,5	76	77	76	73	75	76,5	75,5
<i>O. bas. Zanzibar</i>	OU	14	15,5	16	18	15	13	13	16	16,5
<i>O. bas. Thyrsiflora</i> Thai-Bas.	OU	13	13,5	13	14,5	13,5	10	11,5	13,5	16
<i>O. micranthemum</i>	OU	39	35,5	36,5	36,5	37,5	30	33,5	35,5	36,5
<i>O. bas. Provence</i>	OU	12,5	10,5	10	8,5	9,5	11,5	9,5	10,5	11
<i>O. bas Korsisches B.</i>	OU	17,5	18	13,5	15,5	15	18	14	14	17,5

Mit Ausnahme der Sorte ‘Superbo‘ konnte bei jeder Sorte eine Hauptgruppe/Sortengenotyp bestimmt werden. Die Sorte ‘Superbo‘ und die jeweils abweichenden Individuen der Sorten ‘Red Rubin‘, ‘BARONESS‘, ‘Eowyn‘ und BASINOVA wurden dementsprechend von der Auswertung ausgeschlossen.

Die größten Unterschied anhand der AFLP-Fingerprints zeigte sich mit 11% zwischen den Genoveser-Sorten ‘Gecom‘ und ‘Red Rubin‘ (Tab. 17). Die geringsten Unterschiede waren zwischen mit 0,5% den Sorten BARONESS und BALLETA sowie den Sorten BAJAZZO und BASINOVA zu be-

obachten. Im Durchschnitt aller Genoveser-Sorten zueinander war ein Unterschied von 5,6 % gegeben. Beim Vergleich der Genoveser-Sorten zu den Wildformtypen der Out-Group zeigte die Sorte ‘Tulsi‘ mit durchschnittlich 75,4% die größte Abweichung zu den Genoveser-Sorten. *O. micranthemum L.* wies eine durchschnittliche Abweichung von 35,6 % zu den Genoveser-Sorten auf. Die Ergebnisse zeigen, dass im Vergleich zu den Sorten der Out-Group alle Genoveser-Sorten näher miteinander verwandt sind.

#### **4.1.4 Regulierung der Luftfeuchtigkeit im Bestand von Basilikum**

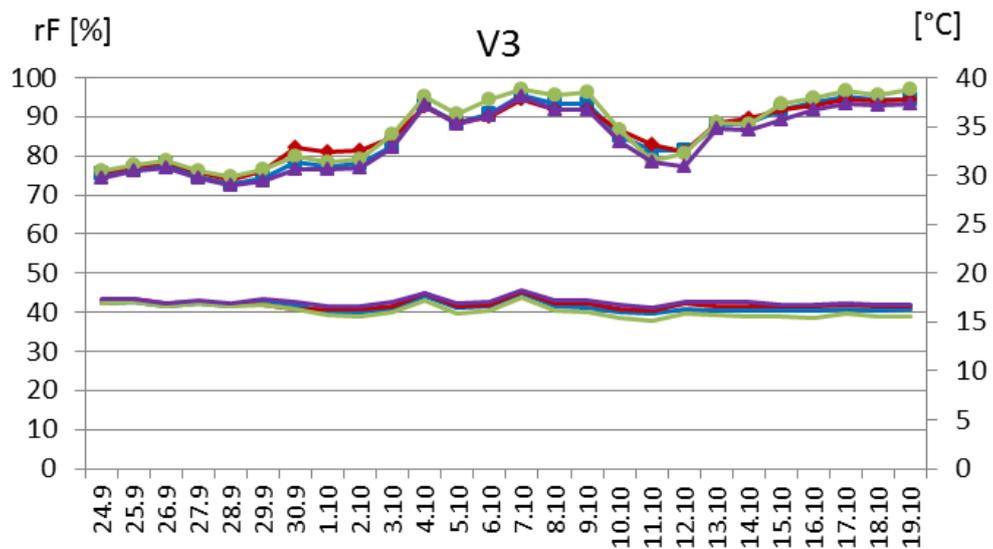
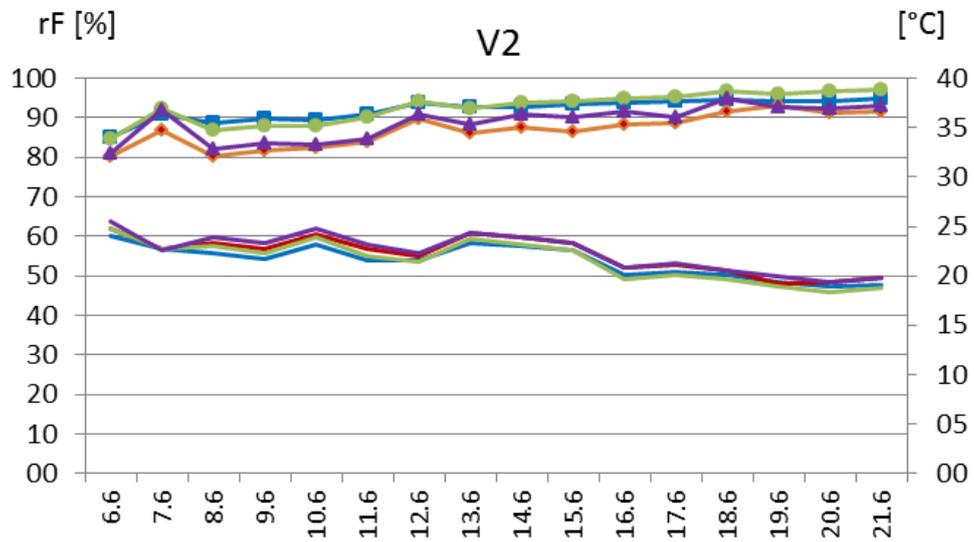
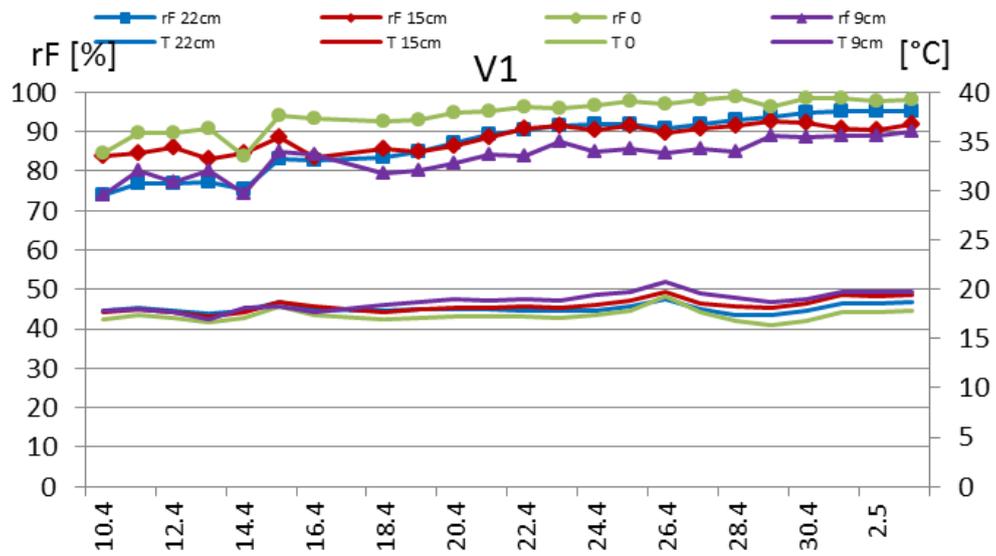
##### **4.1.4.1 Regulierung der Luftfeuchtigkeit in der Topfkultur im Bestand von Basilikum**

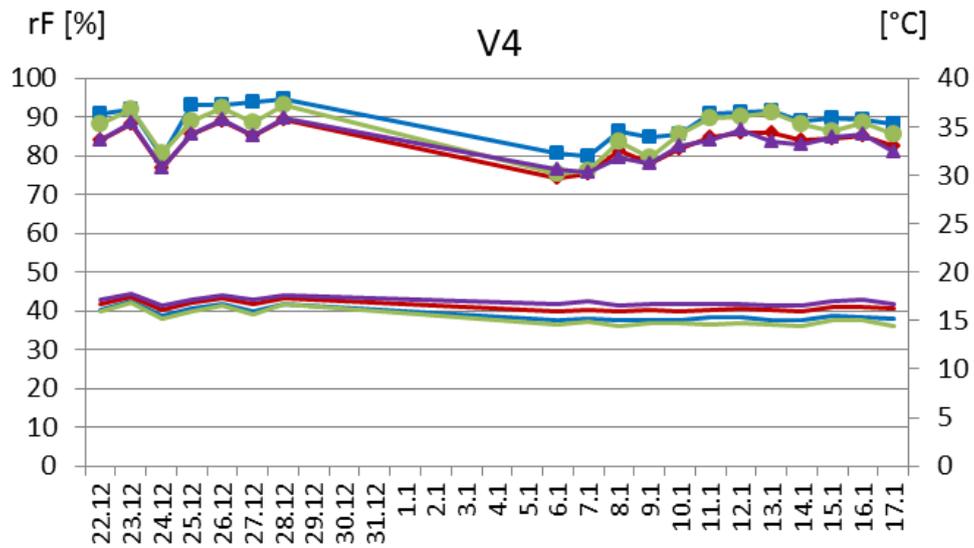
In 2015 und 2016 wurden zunächst in mehreren Basilikum-Sätzen der Einfluss der Abstand der Heizrohre (Vorauftemperatur 40°C) zum Bestand auf die relative Luftfeuchtigkeit (rF) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass geringste rF erreicht werden kann, wenn die Heizrohre direkt in der Höhe der Topfoberkante (9 cm über dem Tischboden) und 6 cm über der Topfoberkante (15 cm über dem Tischboden) angeordnet werden (Abb. 9a und 9b).

##### **4.1.4.2 Prüfung der Krankheitsentwicklung in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit im Bestand von Basilikum**

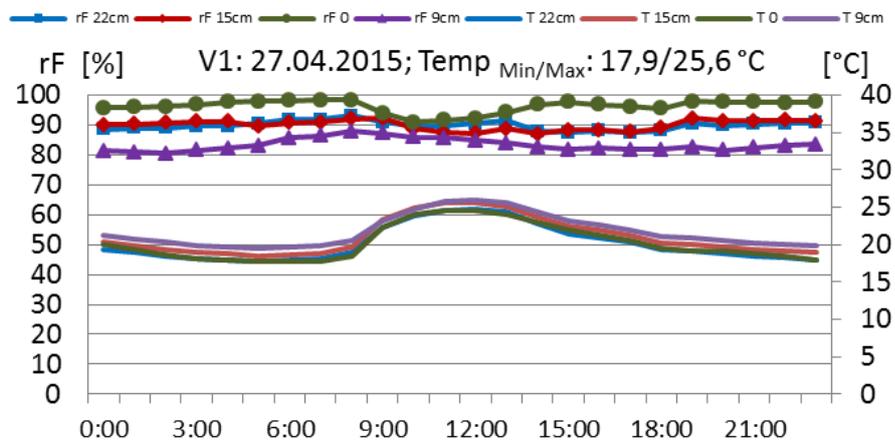
Die epidemiologische Ausbreitung des FM wurde unter den Bedingungen geprüft, unter der die höchste Reduktion der rF erzielt werden konnte. Die epidemische Ausbreitung des FM kann durch Reduktion der rF deutlich reduziert werden, jedoch nicht zu 100% verhindert werden (Abb. 10a-d).

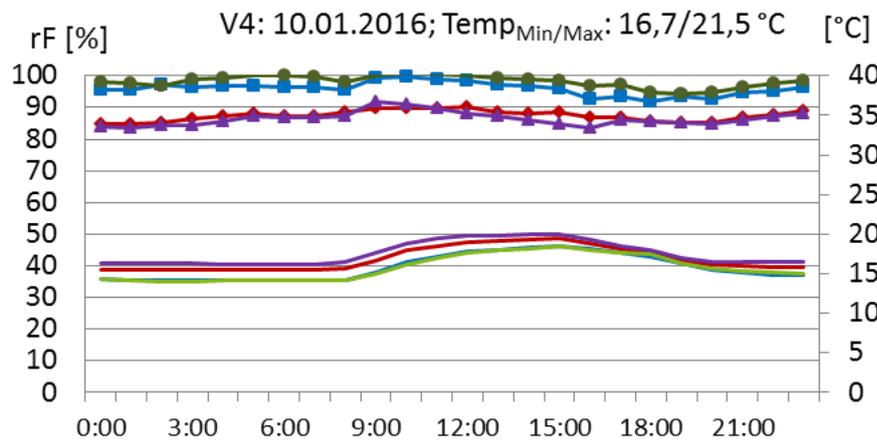
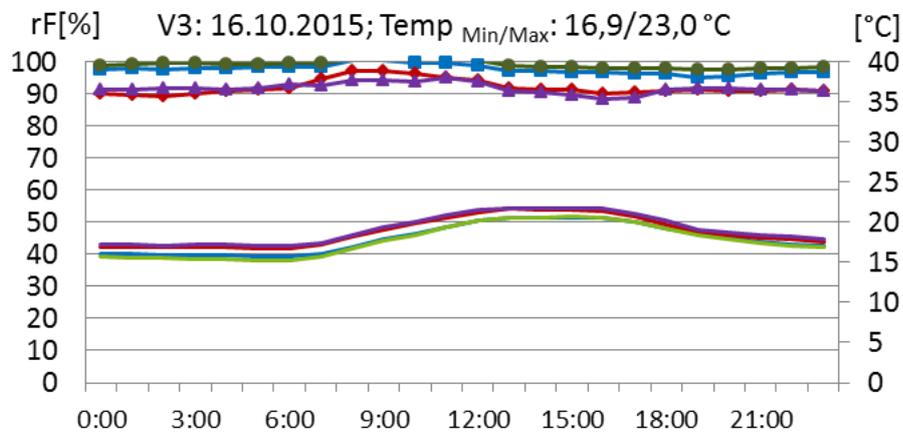
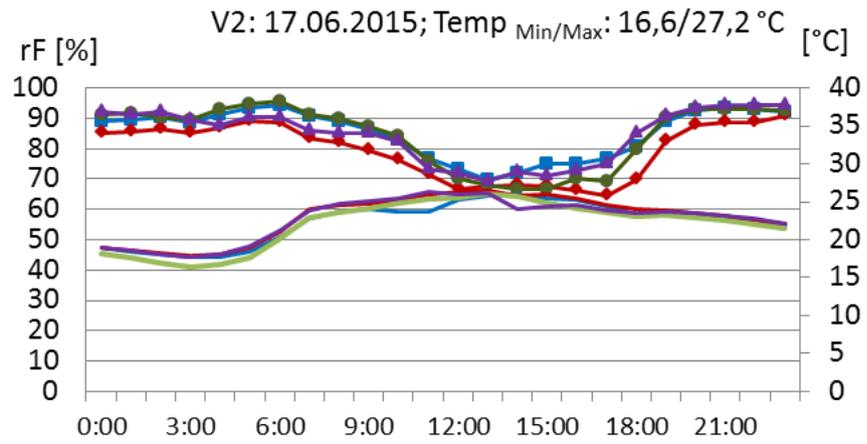
Im Jahres-Verlauf wurden unter Gewächshausbedingungen verschiedene Versuche zur epidemiologischen Entwicklung des FM durchgeführt. Dabei zeigte sich eine raschere Befallsentwicklung in den Frühjahr- und Sommermonaten, während in den Herbst- und Wintermonaten diese deutlich geringer war. Obwohl die Befallsentwicklung im Bestand des Basilikums (nach Ausbringung des FM Inokulum) deutlich von Versuch zu Versuch variierte, war im Vergleich zu den Kontroll-Varianten in allen Versuchen in den Varianten mit reduzierter rF eine geringere BH mit FM zu verzeichnen (T3) (Abb. 10a-d und 11). Bei reduzierter rF war auch im Vergleich zu der Kontroll-Variante eine geringere BS zu beobachten (Abb. 10a-d).



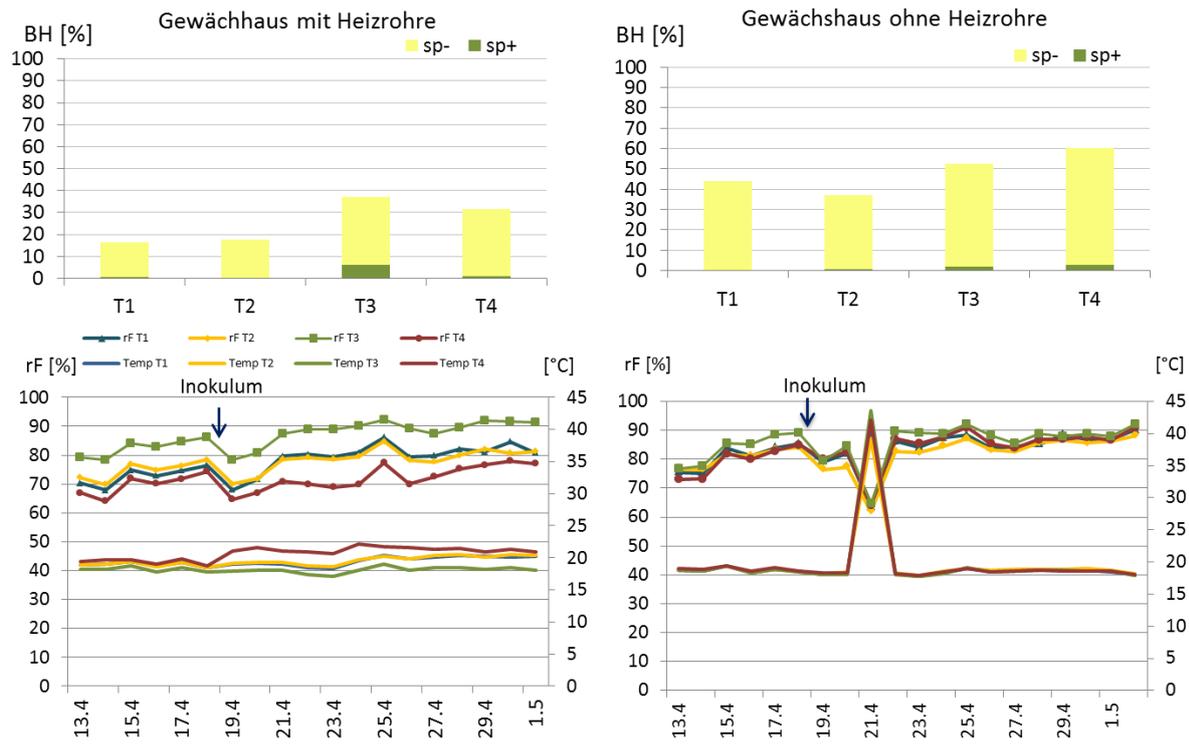


**Abb. 9a:** Temperatur und rel. Luftfeuchtigkeit (rF) im Bestand von Basilikum bei einer Vorlauftemperatur in den Heizrohren von 40°C und in Abhängigkeit vom Abstand der Heizrohre zum Tisch: 22 cm (blau); 15 cm (rot); 9 cm (lila); 0 (grün); aus vier Basilikumsätze (V1, V2, V3, V4) um 6.00 Uhr

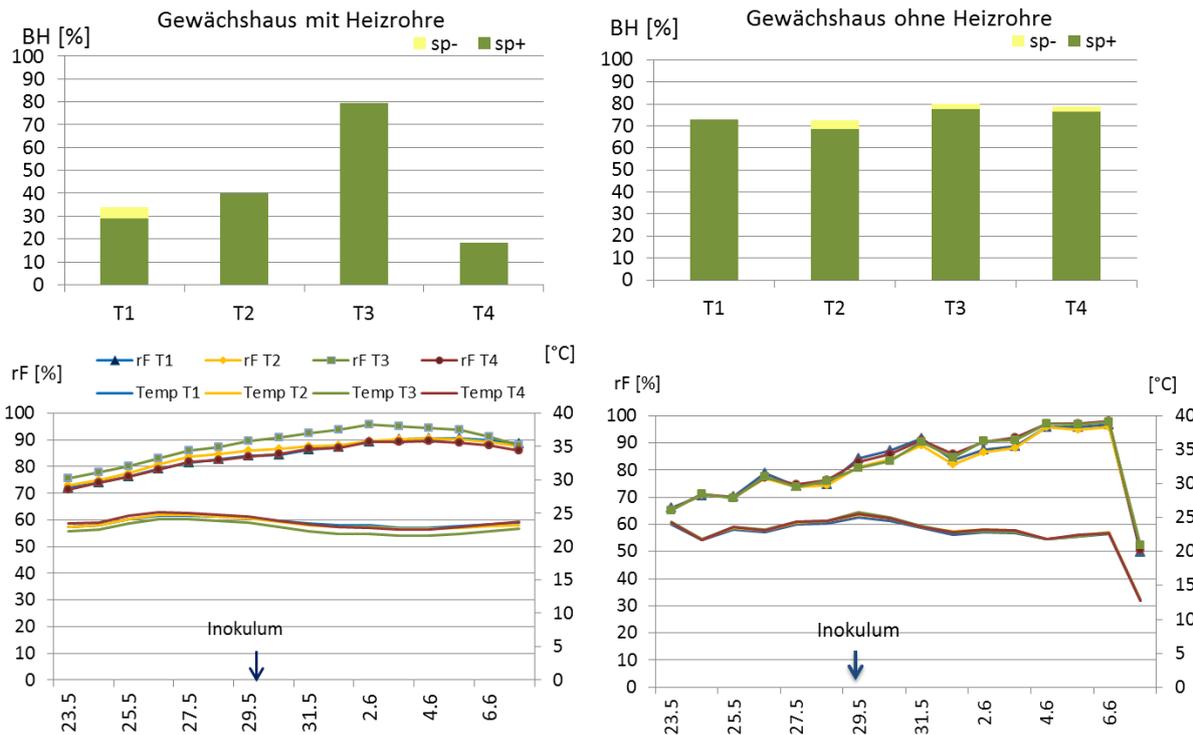




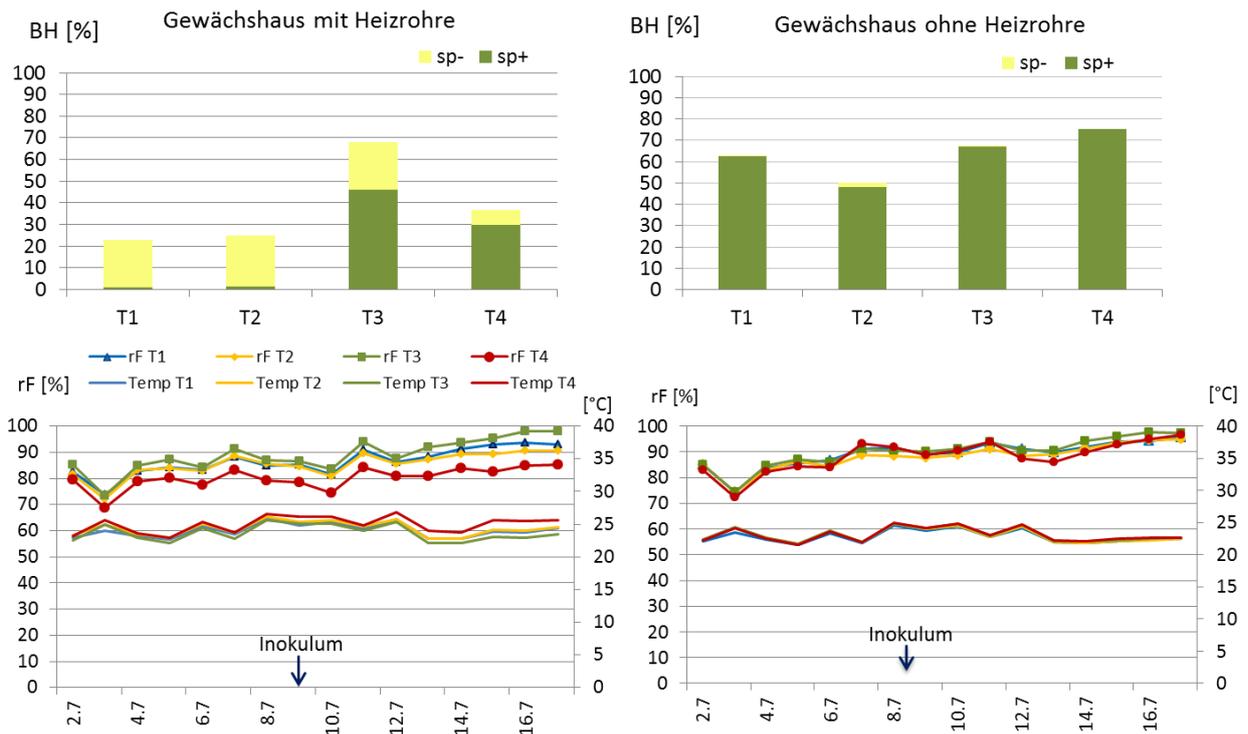
**Abb. 9b:** Temperatur und rel. Luftfeuchtigkeit (rF) im Bestand von Basilikum bei einer Vorlauftemperatur in den Heizrohren von 40°C und in Abhängigkeit vom Abstand der Heizrohre zum Tisch: 22 cm (blau); 15 cm (rot); 9 cm (lila); 0 (grün); für einen ausgesuchten Tag im 6-Blatt-Stadium von Basilikum aus vier Versuchen (V1, V2, V3, V4)



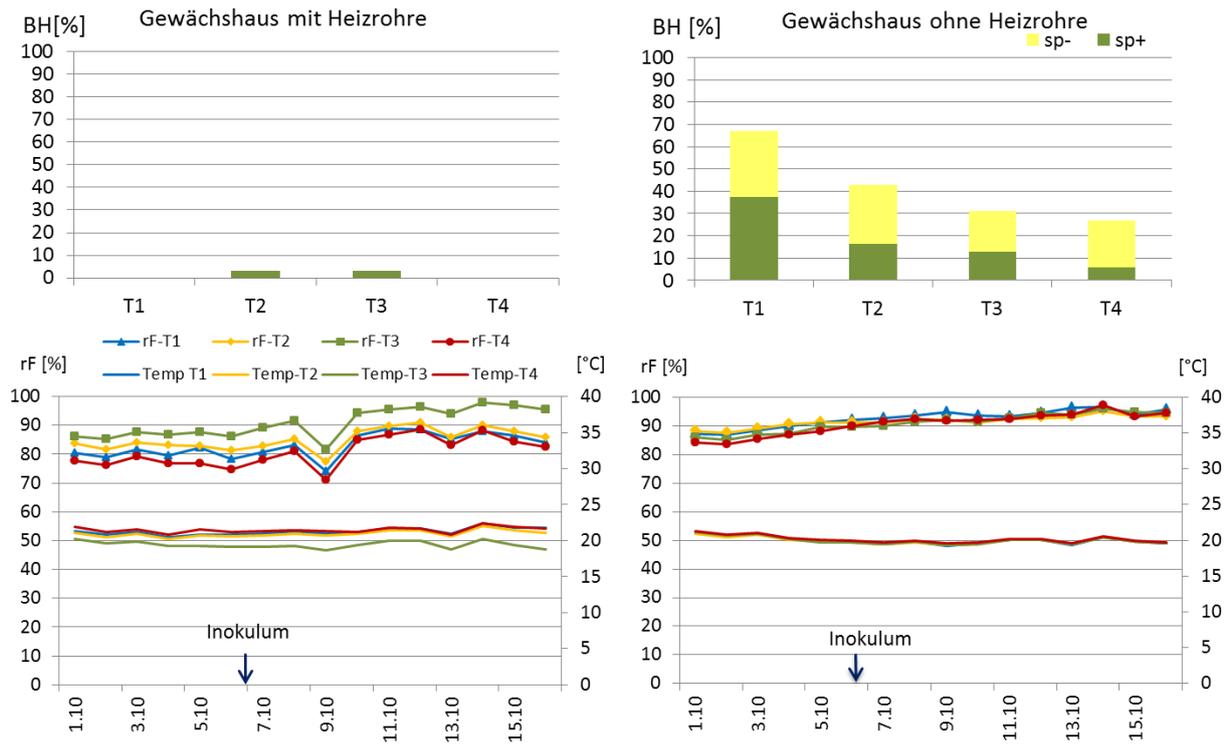
**Abb. 10a:** Prozentualer Anteil mit FM befallener Basilikum-Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit (rF), variiert durch installieren von Heizrohre über dem Bestand (Tische T1, T2, T4), im Vergleich zur BH zur Kontrollvariante ohne Heizrohre (T3). Der Verlauf der rF und Temperatur erfolgte ab 6.00 Uhr vom 13.4. (Inokulation des Bestandes mit FM) bis 1.5.2017. Die BH wurde 10 Tage nach der Inokulation (dpi) erfasst. sp-: keine Erregersporulation; sp+: Erregersporulation auf den Blättern.



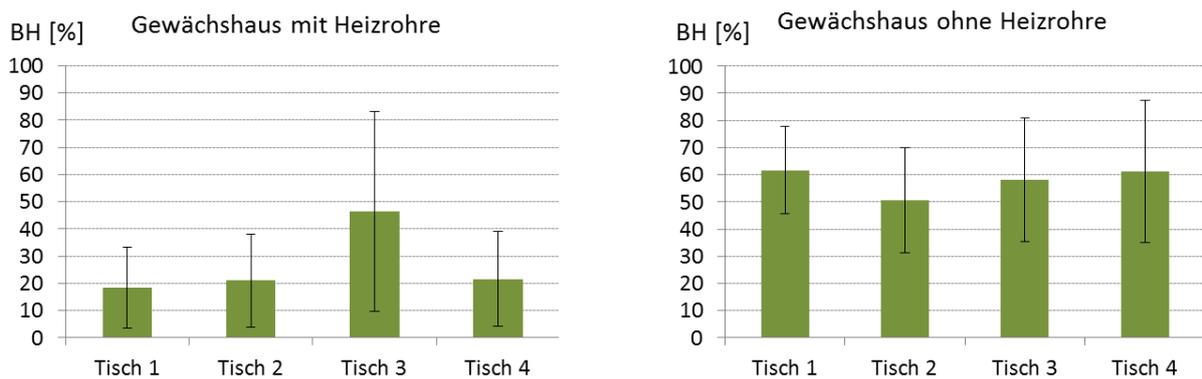
**Abb. 10b:** Prozentualer Anteil mit FM befallener Basilikum-Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit (rF), variiert durch installieren von Heizrohre über dem Bestand (Tische T1, T2, T4), im Vergleich zur BH zur Kontrollvariante ohne Heizrohre (T3). Der Verlauf der rF und Temperatur erfolgte ab 6.00 Uhr vom 23.5. (Inokulation des Bestandes mit FM) bis 6.6.2017. Die BH wurde 10 Tage nach der Inokulation (dpi) erfasst. sp-: keine Erregersporulation; sp+: Erregersporulation auf den Blättern.



**Abb. 10c:** Prozentualer Anteil mit FM befallener Basilikum-Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit (rF), variiert durch installieren von Heizrohre über dem Bestand (Tische T1, T2, T4), im Vergleich zur BH zur Kontrollvariante ohne Heizrohre (T3). Der Verlauf der rF und Temperatur erfolgte ab 6.00 Uhr vom 2.7. (Inokulation des Bestandes mit FM) bis 16.7.2017. Die BH wurde 10 Tage nach der Inokulation (dpi) erfasst. sp-: keine Erregersporulation; sp+: Erregersporulation auf den Blättern.



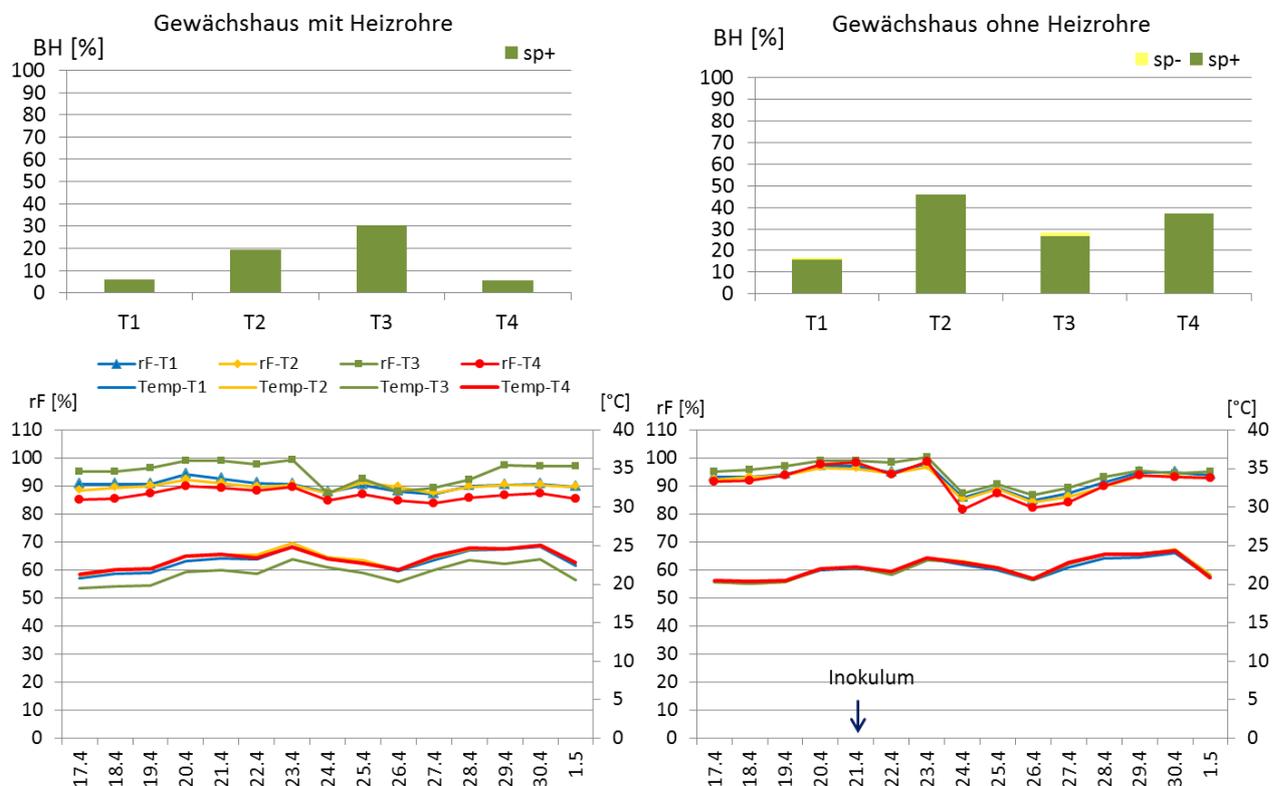
**Abb. 10d:** Prozentualer Anteil mit FM befallener Basilikum-Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit (rF), variiert durch installieren von Heizrohre über dem Bestand (Tische T1, T2, T4), im Vergleich zur BH zur Kontrollvariante ohne Heizrohre (T3). Der Verlauf der rF und Temperatur erfolgte ab 6.00 Uhr vom 1.10. (Inokulation des Bestandes mit FM) bis 15.10.2017. Die BH wurde 10 Tage nach der Inokulation (dpi) erfasst. sp-: keine Erregersporulation; sp+: Erregersporulation auf den Blättern.



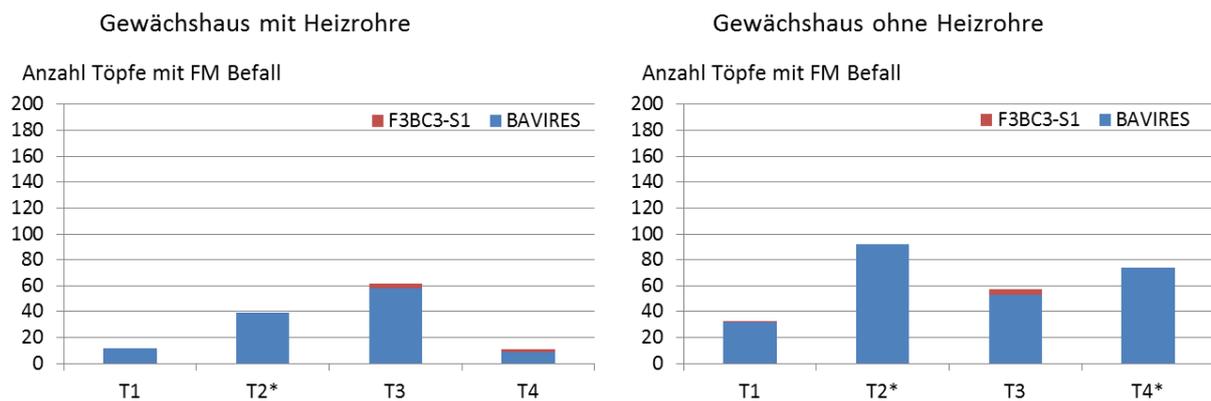
**Abb. 11:** Mittlerer prozentualer Anteil mit FM befallener Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) auf den Tischen T1, T2, T3 und T4 (mit Heizrohre) und T4 (ohne Heizrohre) unter Gewächshausbedingungen aus vier Versuchen. Balken stellen den errechneten Konfidenzintervall dar.

#### 4.1.4.3 Prüfung der Befallsentwicklung des FM während der Kultur der wenig anfälligen F3BC3-S1 unter praxisüblichen Bedingungen im Gewächshaus

Vergleichbar zu den Versuchen bezüglich der epidemiologischen Entwicklung von FM an einer gegenüber dem Erreger empfindlichen Sorte wurde die epidemische Ausbreitung des FM an einem wenig empfindlichen Genotyp F3BC3-S1 in Abhängigkeit von der rF untersucht. Die rF wurde mittels Heizrohre (Vorlauftemperatur 40°C) reduziert. Im Vergleich zur Gewächshauskabine mit höherer rF (ohne Heizrohre) war bei geringerer rF eine geringere BH in allen Varianten zu beobachten (Abb. 13). Bei geringerer rF war an den symptomatischen pflanzen keine Sporulation des FM Erregers gegeben (Abb. 12). Nur wenige Pflanzen aus der F3BC3-S1 Generation zeigten einen Befall mit FM im Gegensatz zur Sorte BAVIRES mit hoher Anfälligkeit gegenüber dem FM (Abb.13).



**Abb. 12:** Prozentualer Anteil mit FM befallener Basilikum-Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit (rF), variiert durch installieren von Heizrohre über dem Bestand (Tische T1, T2, T4), im Vergleich zur BH zur Kontrollvariante ohne Heizrohre (T3). Der Verlauf der rF und Temperatur erfolgte ab 6.00 Uhr vom 17.4. (Inokulation des Bestandes mit FM) bis 1.5.2018. ie BH wurde 10 Tage nach der Inokulation (dpi) erfasst. sp-: keine Erregersporulation; sp+: Erregersporulation auf den Blättern. In diesem Versuch wurden Pflanzen der F3BC3-S1 Generation geprüft.



**Abb. 13:** Prozentualer Anteil mit FM befallener Basilikum-Töpfe (Befallshäufigkeit, BH) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit (rF), variiert durch installieren von Heizrohre über dem Bestand (Tische T1, T2, T4), im Vergleich zur BH zur Kontrollvariante ohne Heizrohre (T3). In diesem Versuch wurde die epidemische Ausbreitung von FM auf BAVIRES und Pflanzen der F3BC3-S1 Generation geprüft. Auf den Tischen gekennzeichnet mit \* wurde die Ausbreitung von FM nur auf BAVIRES geprüft.

## 4.2 Teil-Projekt GHG (2812NA115)

### 4.2.1 Selektion von 90 NILs mit zufälligem Teil des Genoms des Donor-Elters

Die Anzahl der zufälligen NILs – geplant waren jeweils 90/Jahr – und der dazu gehörenden Pflanzen (im Idealfall  $90 \times 3 = 270$  Pflanzen) und die Zahl der gelungenen Kreuzungen sind in Tab. 18 zusammengefasst. Die Anzahl der durchgeführten Kreuzungen ist dabei deutlich höher. Es wurde mindestens eine Kreuzung je Pflanze, in einigen Fällen auch mehrere Kreuzungen je Pflanze durchgeführt. Bedingt durch geringe Kornzahlen und/oder fehlende Keimfähigkeit blieb die tatsächliche Zahl der Pflanzen geringfügig unter dem Optimum. Am Ende des Projektes, nach 3 Anbaujahren, waren immerhin noch 82 der ursprünglich im ersten Jahr angebauten 90 zufälligen NILs vorhanden.

**Tabelle 18:** Anzahl der zufälligen NILs, der angebauten Pflanzen und der gelungenen Kreuzungen in den Projektjahren 2014, 2015 und 2016

Jahr	zuf. NILs	x Pflanzen	Pflanzen gesamt	gelungene Kreuzungen *)
2014	80	3	240	
	4	2	8	
	1	1	1	
Summe	85		249	226
2015	74	3	222	
	6	2	12	
	5	1	5	
Summe	85		239	218
2016	79	3	237	
	1	2	2	
	2	1	2	
Summe	82		241	236

\*) mindestens 1 Kreuzungskorn geerntet

In allen Jahren wurden die wichtigsten Merkmale aller Einzelpflanzen erfasst. Dabei wurden folgende Ausprägungen beobachtet:

- Pflanzentyp: Genoveser, Wild- und intermediärer Typ. Der Genoveser Typ ist charakterisiert durch rundovale, mittelgroße bis große, an den Rändern mittel bis stark nach unten innen gewölbte Blätter, weiße Blütenfarbe und fehlende Behaarung an Blättern und Stängeln. Der Wildtyp zeichnet sich durch kleine, dreieckige, spitz zulaufende, glatte Blätter, Behaarung an Blättern und Stängeln und bläuliche Blüten aus. Intermediäre Typen haben ovale bis dreieckig spitz zulaufende Blätter, eine schwache Blattwölbung sowie Behaarung an Blättern und Stängeln. Die Blütenfarbe ist unterschiedlich.
- Die Blütenfarben variierten von weiß über rosa, hellblau, lila oder pink.
- Geruch: basilikum-typisch (= Genoveser Typ), schwach typisch und nicht typisch. Die untypischen Gerüche reichten von „völlig geruchlos“, „gras-ähnlich“, über „fruchtig“ (nicht eindeutig – Stachelbeere- oder Apfel-ähnlich), schwach fruchtig, deutlichem Zitronenaroma bis hin zu starkem oder schwachem Anisgeruch.
- Blühbeginn: Die frühesten Pflanzen blühten im Jahr 2014 am 13. Juli, 2015 am 12. Juli und 2016 am 07. Juli, die spätesten: 2014 am 06. August, 2015 am 09. August und 2016 am 23. Juli. In allen Jahren gab es Pflanzen, die nicht zur Blüte kamen.
- Pflanzenlänge: Minimum und Maximum schwankten im Jahr 2015 von 15 bis 117 cm, im Jahr 2016 von 20 bis 115 cm.

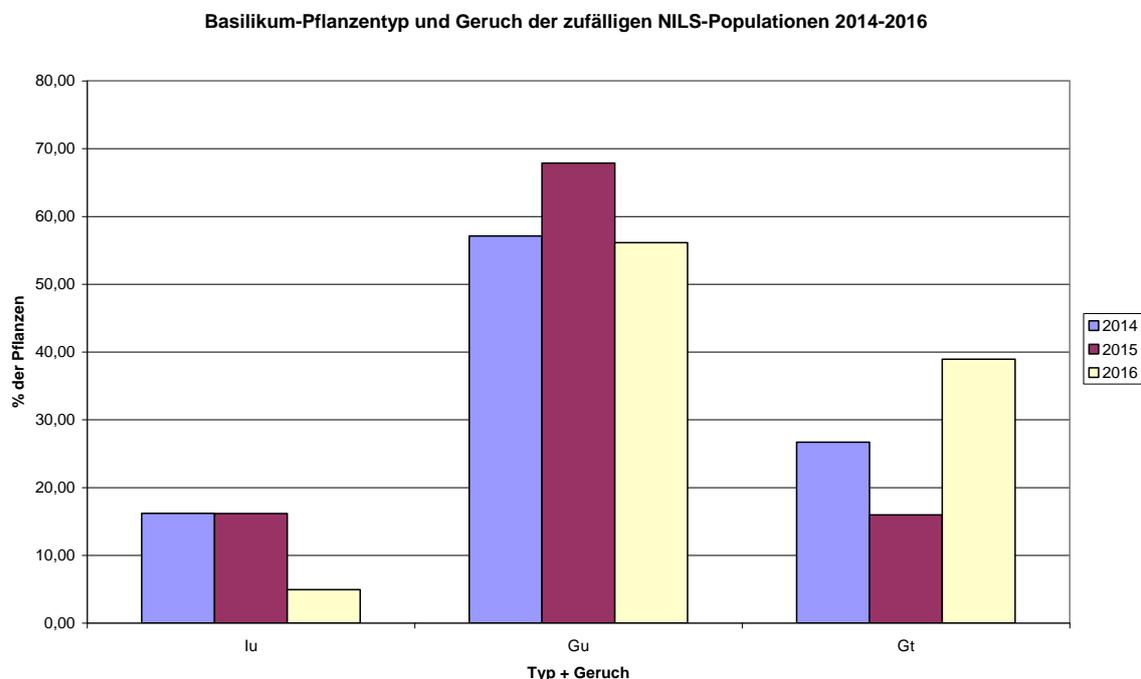
Blühbeginn und Pflanzenlänge haben auch innerhalb der Genoveser Typen eine große Variationsbreite. Die Merkmale Pflanzentyp, Blütenfarbe und Geruch sind demgegenüber deutliche Indizien für die Anreicherung der Gene des gewünschten Basilikum-Typs. Die Merkmale wurden daher in Grup-

pen zusammengefasst und die Anzahl der Pflanzen in den jeweiligen Gruppen in den 3 Projektjahren aufsummiert und prozentual umgerechnet. Für eine vermarktungsfähige Basilikumsorte sind in erster Linie der Typ (= Genoveser Typ) und der Basilikum-typische Geruch von Bedeutung. Die vom Wildtyp stammende bunte Blütenfarbe ist zwar untypisch für die ausschließlich weiß blühenden Genoveser Typen, stört aber hinsichtlich der Vermarktung als Küchenkraut nicht.

In Tab. 19 und Abb. 14 sind die drei Merkmals-Hauptgruppen - ohne Berücksichtigung der Blütenfarbe - in den Jahren 2014 bis 2016 aufgelistet bzw. dargestellt. Während die Veränderung der Anteile der Gruppen vom Jahr 2014 auf 2015 noch relativ gering ist, zeigt sich im Jahr 2016 die erwartete Abnahme des intermediären Typs mit untypischem Geruch und die Zunahme des Genoveser Typs mit stark oder schwach typischem Geruch.

**Tabelle 19:** Prozentuale Anteile der Pflanzen mit den Haupt-Merkmal kombinationen (ohne Blütenfarbe) in den Jahren 2014 bis 2016

Merkmale	Abk.	2014	2015	2016
intermediärer Typ mit untypischem Geruch	<b>Iu</b>	15,66	14,70	4,92
Genoveser mit untypischem Geruch	<b>Gu</b>	56,62	66,39	56,14
Genoveser mit typischem oder schwach typischem Geruch	<b>Gt</b>	26,11	14,48	38,94



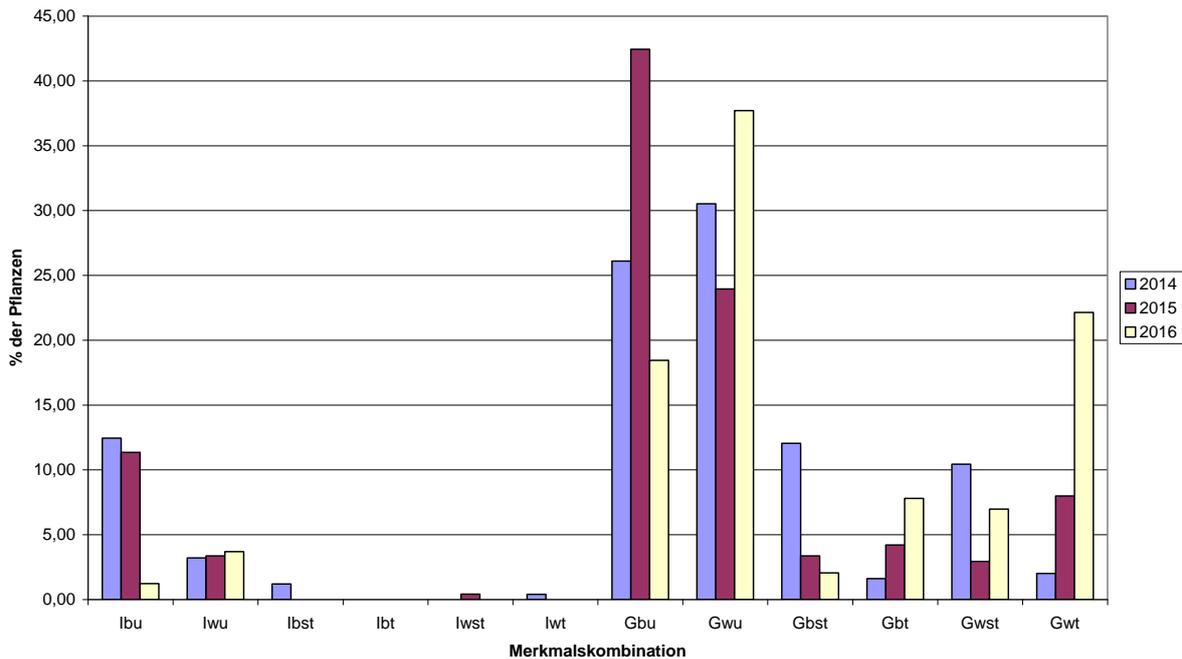
**Abb. 14:** Prozentuale Anteile der Pflanzen mit den Haupt-Merkmal kombinationen in den Jahren 2014 bis 2016 (Abk. siehe Tab. 20)

In Tab. 20 und Abb. 15 sind die Merkmalskombinationen unter Einbeziehung der Blütenfarbe dargestellt. Auch hier ist zu erkennen - wie bereits in der vorherigen Tabelle bzw. Darstellung -, dass die Gruppe „Genoveser Typ mit untypischem Geruch“ in allen Jahren deutlich mehr als die Hälfte aller Pflanzen einnimmt. Die Blütenfarbe schwankt innerhalb dieser Gruppe in den Jahren unterschiedlich und folgt keiner erkennbaren Gesetzmäßigkeit. Die „Extrem“-Typen – d.h. einerseits der Wild- oder intermediäre Typ mit bunter Blüte und untypischem Geruch und andererseits der Genoveser Typ mit weißer Blüte und typischem Geruch – sind in der ersten und letzten Tabellenzeile bzw. den linken und rechten Säulen des Diagramms zu sehen. Es zeigt sich eine Abnahme des ersteren und eine Zunahme des letztgenannten Typs. Diese ist aber auch hier nicht kontinuierlich, sondern mit einem größeren Sprung vom Jahr 2015 zum Jahr 2016. Die Zunahme des Anteils der gewünschten Genoveser Typen erreicht nach einem Wert von rund 2 % im Jahr 2014 einen Wert von über einem Fünftel (rund 22 %) aller untersuchten Pflanzen der zufälligen NILs-Populationen.

**Tabelle 20:** Prozentuale Anteile der Pflanzen mit den Haupt-Merkmalskombinationen unter Einbeziehung der Blütenfarbe in den Jahren 2014 bis 2016

Merkmale	Abk.	2014	2015	2016
intermediärer oder Wildtyp mit bunter Blüte u. untypischem Geruch	Ibu	12,45	11,34	1,23
intermediärer oder Wildtyp mit weißer Blüte u. untypischem Geruch	Iwu	3,21	3,36	3,69
intermediärer oder Wildtyp mit bunter Blüte u. <b>schwach</b> typischem Geruch	Ibst	1,20	0,00	0,00
intermediärer oder Wildtyp mit bunter Blüte u. typischem Geruch	Ibt	0,00	0,00	0,00
intermediärer oder Wildtyp mit weißer Blüte u. <b>schwach</b> typischem Geruch	Iwst	0,00	0,42	0,00
intermediärer oder Wildtyp mit weißer Blüte u. typischem Geruch	Iwt	0,40	0,00	0,00
Genoveser Typ mit bunter Blüte und untypischem Geruch	Gbu	26,10	42,44	18,44
Genoveser mit weißer Blüte u. untypischem Geruch	Gwu	30,52	23,95	37,70
Genoveser mit bunter Blüte u. <b>schwach</b> typischem Geruch	Gbst	12,05	3,36	2,05
Genoveser mit bunter Blüte u. typischem Geruch	Gbt	1,61	4,20	7,79
Genoveser mit weißer Blüte u. <b>schwach</b> typischem Geruch	Gwst	10,44	2,94	6,97
Genoveser mit weißer Blüte u. typischem Geruch	Gwt	2,01	7,98	22,13

Phänotypische Merkmale der Basilikum zufälligen-NILS-Populationen 2014 - 2016



**Abb. 15:** Prozentuale Anteile der Pflanzen mit den Haupt-Merkmalskombinationen unter Einbeziehung der Blütenfarbe in den Jahren 2014 bis 2016 (Abk. siehe Tab. 21)

Zusätzliche Arbeiten im Rahmen der Projektverlängerung im Jahr 2017:

Von den 22 Klonen der resistenten bzw. toleranten Klon-Mutterpflanzen wurde einer verworfen, weil die Klonpflanzen untypisch rochen und intermediären Typs waren. Von den 21 übrig gebliebenen Klonen wurden jeweils 9 bzw. 10 Pflanzen am 11. und 26. April 2017 zum IGZ nach Großbeeren gebracht, wo sie weiter kultiviert und nach Selbstung (jede Pflanze wurde individuell mit einer Isoliertüte versehen) zur Samenreife gebracht werden sollten.

Weitere Klonpflanzen - die Zahl schwankte von 16 bis 48 je Klon - wurden bei GHG Saaten in Aschersleben in insektensicheren Kleingewächshäusern angebaut. In Großbeeren sollte die Ernte einzelpflanzenweise und in Aschersleben jeweils als Ramsch erfolgen. Die Einzelpflanzen aus Großbeeren sollten für den weiteren Zuchtaufbau genutzt werden, die Ramsche aus Aschersleben für Musterprüfungen und Kulturführungsversuche.

Die geernteten Einzelpflanzen wurden am 21.09.2017 von Großbeeren nach Aschersleben gebracht und dort ausgedroschen.

In Übereinstimmung mit der Erntemenge und der Prüfkapazität am IGZ wurden je 5 ertragreiche Einzelpflanzen von 19 Klonen ausgewählt von diesen je 40 bzw. 50 Körner am 29.09.2017 zum Resistenztest an das IGZ geschickt (insgesamt 95 Pflanzen).

Zusätzlich wurden von den 84 ertragreichsten Pflanzen je 5 x 30 Körner für den Kulturführungsversuch nach Großbeeren geschickt. Diese stammten von 15 Klonen und umfassten von einer bis zu zehn Pflanzen. Es zeigte sich, dass es Klone gibt, bei denen jeweils sehr viele Pflanzen entweder sehr hohe oder sehr niedrige Erträge haben. Der Versand erfolgte am 01.12.2017 und wurde am 06.03.2018 noch einmal wiederholt, da der Kulturführungsversuch noch ein zweites Mal durchgeführt werden musste.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Ergebnisse des Teilprojektes IGZ**

#### **5.1.1 Erstellung einer Population von NILs von Basilikum und Selektion von Linien mit Resistenz gegen den FM**

Ziel dieses Projektes war die Erstellung einer Population von NILs von Basilikum, welche als Basis für die Züchtung von Basilikumsorten mit Resistenz gegen FM dienen sollte. Als Ausgangsmaterial diente ein aus dem vorhergehenden Projekt (FKZ: 28-1-41.012-06) mit Basilikum entstandenes Zuchtmaterial, welches aus Kreuzungen zwischen hochanfälligen Sorten des Genoveser Typs und den als resistent selektierten Wildformen, ‚Apfelbasilikum‘ und ‚Heiliges Basilikum‘ (F2 Generation) generiert wurde. Da diese Generation noch stark vom Wildpflanzencharakter dominiert war, wurde das Material beim Züchter (GHG) erneut mit dem Genoveser Typ rückgekreuzt und selektiert (F2BC1). Nach jeder Rückkreuzung basiert die vom Züchter durchgeführte Selektion der entstandenen Nachkommen neben dem Merkmal Resistenz auf Merkmale wie Geruch, Farbe und Form, die den Ansprüchen der Verbraucher entsprechen. Die Pflanzen, die aus dieser F2BC1-Generation hervorgingen und als Ausgangsmaterial für den Projektstart einer Resistenzprüfung unterzogen wurden, erwiesen sich alle als sehr anfällig gegen FM. Möglicherweise war die Selektion dieser Pflanzen zu stark auf die äußeren Merkmale gerichtet.

Daher wurden nochmals Nachkommen der F2 Generation, also F3 Generation, auf Resistenz gegen FM geprüft. Im Ergebnis dieser Prüfungen konnten einige nicht anfällige Genotypen identifiziert werden. Nachfolgend wurden drei Rückkreuzungen (mit jeweilige Resistenzprüfungen) durchgeführt und als Ergebnis eine F3BC3 Generation mit ca. 10 wenig anfälligen und 12 mittelanfälligen Pflanzen selektiert. Diese wurden geselbstet, sodass deren Selbstungs-Nachkommen F3BC3-S1 einer letzten Resistenzprüfung unterzogen wurde. Die Mehrzahl der geprüften Selbstungs-Nachkommen der F3BC3 erwies sich als hoch anfällig. Unter den geprüften Pflanzen waren jedoch ca. 140 Pflanzen mit einer geringen bzw. keiner Anfälligkeit gegenüber dem FM.

Bei Pflanzen wird die Widerstandsfähigkeit gegenüber Krankheiten und Schädlingen als Resistenz bezeichnet. Pflanzen, welche die Entwicklung eines Schaderregers nicht einschränken können, werden

als anfällig betrachtet. Eine resistente Pflanze ist in der Lage, Wachstum und Entwicklung des betreffenden Schaderregers im Vergleich zu anfälligen Pflanzen unter vergleichbaren Umweltbedingungen und vergleichbarem Schaderregerdruck zu begrenzen. Bei einem hohen Schaderregerdruck können jedoch auch bei resistenten Pflanzen Krankheitssymptome und Schädigungen auftreten. Deshalb wird zwischen Hoher Resistenz (HR) und Intermediärer Resistenz (IR) unterschieden. Bei HR kann das Wachstum und die Entwicklung des betreffenden Schaderregers generell in hohem Maße eingeschränkt werden. Im Vergleich zu HR kommt es bei IR nach Befall durch den Erreger zu stärkeren Symptomen, diese sind jedoch immer noch geringer im Vergleich zu anfälligen Pflanzen, die unter vergleichbaren Umweltbedingungen und Schaderregerdruck (Inokulum) angebaut wurden. Aufgrund dieser Definition könnte man die wenig anfälligen Pflanzen, die im Verlauf dieses Projektes selektiert wurden, als intermediär resistent bezeichnen. Solche graduellen Resistenzreaktionen beruhen möglicherweise auf einer Vielzahl polygen gesteuerter Resistenzmechanismen der Pflanze und können auch als quantitative Resistenz bezeichnet werden. Wegen dieser polygenen (quantitativen) Resistenz-Vererbung war es nicht möglich in diesem Projekt NILs zu generieren. Das in Abb. 1 vorgestellte Kreuzungs – bzw. Introgressions- Schema wurde zwar für die Entwicklung von resistenten Basilikumsorten verwendet, jedoch mit dem Ergebnis einer F3BC3-S1-Nachkommenschaft.

Die Ermittlung des Erbgangs der Resistenz bedarf der Untersuchung der Nachkommen der F1- und F2-Generation sowie dazwischen durchgeführten Selbstungen. Ben-Naim et al. (2015) berichten von Vielseitigkeit der Resistenzgene der F1-Populationen, die aus Kreuzungen zwischen resistenten Basilikum Wildformen und Basilikum des Genoveser Typs hervorgegangen sind. Aus ihren Kreuzungsversuchen schließen sie auf dominante, teils-dominante und rezessive Gene in resistenten Genotypen und empfehlen die Nutzung dieses Potentials in das Züchtungsprogramm von Basilikum. Da in diesem Projekt mit der F3-Generation gestartet wurde, sind keine Aussagen zur F1- und F2-Generation möglich. Die Tatsache, dass in den vorliegenden Arbeiten sowohl hoch anfällige als auch nicht anfällige Pflanzen in der F3-Generation enthalten waren, unterstützt die Aussage von Ben-Naim et al. (2015) bezüglich der Vielseitigkeit der Resistenzgene. Andererseits wird eher vermutet, dass das Resistenzverhalten der F3BC3-Generation, auf eine Vielzahl polygen gesteuerter Resistenzmechanismen zurückgeführt werden kann, da deren Nachkommen sich sowohl als intermediär anfällig bzw. resistent erwiesen.

Die ursprünglich im ersten Basilikumprojekt als resistent eingestuften Wildformen ‚Apfelbasilikum‘ und ‚Heiliges Basilikum‘ zeigten in all den Resistenzprüfungen, in denen sie mitgeprüft wurden, keine Resistenz, sondern waren mittel anfällig. Hier ist darauf hinzuweisen, dass das Saatgut dieser beiden Wildformen in 2007 von herkömmlichen Saatgutvertriebsfirmen zugekauft und später von GHG vermehrt (Selbstungen) wurde. Möglicherweise handelte sich bei diesem Saatgut um nicht-homogenes Material, so dass nach der Saatgutvermehrung durch Selbstungen die Resistenz, die bei einigen Pflanzen vorhanden war, an die Selbstungs-Nachkommen nicht (voll) vererbt wurde.

Zu Beginn des Projektes wurde davon ausgegangen, dass aus dem resistenten Ausgangsmaterial eine große Anzahl an resistenten Nachkommen generiert werden kann und davon nur einige Pflanzen, stabile Resistenzeigenschaften aufweisen, welche für die weitere Bearbeitung mittels AFLP herausselektiert werden könnten. Dies war aber nicht möglich, da sich die Resistenz, die bei den F3-Genotypen festgestellt wurde, bei den Klonen nicht zeigte. Aus diesem Grund wurden die Arbeiten zur markergestützten Selektion mittels AFLP Technik eingestellt, da hierfür eine eindeutige Resistenz hätte vorliegen müssen. Zudem war unter den Donor-Eltern keine eindeutige Resistenz mehr zu finden.

Die Interaktion zwischen einer Pflanze und einem Pflanzenschädling ist sehr komplex. Schaderreger sind nicht immer in der Lage, eine Erkrankung in der Pflanze hervorzurufen. Neben den Abwehrkräften der Pflanze spielen Umwelteinflüsse und das Entwicklungsstadium der Pflanze eine wichtige Rolle bei der Krankheitsabwehr. Die Stabilität der festgestellten Resistenz aus der F3-Nachkommenschaft wurde deshalb an Klone in unterschiedlichem Alter (fünf und eine Woche alte Klone), die unter zwei unterschiedlichen Temperaturen (23°C und 18°C) herangezogen waren, geprüft. Es zeigte sich, dass jüngere Klone anfälliger waren und die ungünstigere Temperaturführung ebenfalls zur Abnahme der Abwehrkräfte in der Pflanze führte.

### **5.1.2 Sammlung von *P. belbahrii*-Isolaten aus Saatgut und Praxisbetrieben und deren genotypische Charakterisierung mittels BOX-PCR**

Für Krankheitsabwehr sind auch die Virulenzeigenschaften eines Schaderregers von Bedeutung. Schaderregerpopulationen weisen eine hohe Flexibilität auf und können sich unter dem Einfluss von Selektionsfaktoren verändern. In der Folge können neue Biotypen, Pathotypen, Rassen oder Stämme auftreten und z.B. die Resistenz von Pflanzen durchbrechen und diese befallen. Es wurden zehn Isolate aus unterschiedlichen Anbaugebieten auf ihre Pathogenität gegen BAVIRES und ‚Eleonora‘ geprüft. Die Ergebnisse aus den Pathogenitätsprüfungen zeigten, dass bis auf ein Isolat (MT3) alle Isolate in der Lage waren, die Sorte BAVIRES und ‚Eleonora‘ zu befallen. An beiden Sorten war eine 100%-ige Befallshäufigkeit gegeben. Die Sorte ‚Eleonora‘ wies im Vergleich zu BAVIRES jedoch eine geringere Befallsstärke auf. Das *P. belbahrii* Referenzisolat ZM13 zeigte im Vergleich zu den anderen Isolaten die höchste Aggressivität und wurde daher in den Resistenzprüfungen weiterhin verwendet. Das Isolat MT3 zeigte sich im Vergleich zu den geprüften Isolaten als wenig aggressiv. Das ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass das Isolat aus einem in 2007 geernteten Saatgut stammte und deshalb an Virulenz verloren hat. Die Ergebnisse der BOX-PCR zeigten, dass es sich bei den untersuchten Isolaten unterschiedlicher Herkunft auch um verschiedene Genotypen handelt.

### **5.1.3 Homogenitätsprüfung von Basilikumsorten mittels AFLP Technik**

Die Analyse der AFLP-Fingerprints hat gezeigt, dass die getesteten Liniensorten eine gewisse genetische Variation aufweisen. BAVIRES wies eine 4%ige Abweichung zum eigentlichen Genotyp auf. Da die Liniensorten von GHG mindestens für sechs Generationen durch Selbstung generiert wurden, wurde eine hohe Homogenität erwartet. Der Grund für die Inhomogenität kann auf die möglicherweise zu geringe Anzahl von Selbstungsgenerationen zurückgeführt werden, sodass keine ausreichende Homozygotie innerhalb der Sorte vorlag. Hinzu kommt die Vermehrung des Saatgutes nach der „Ramsch-Methode“ (Nachkommen von mehreren Pflanzen werden vermischt). Auch eine Verunreinigung des Saatgutes mit anderen Sorten ist nicht auszuschließen, wenn Vermehrungsflächen anderer Sorten in zu geringen räumlichen Abstand angebaut werden.

Der Vergleich der AFLP-Fingerprints der Sorten zeigen, dass die Genoveser-Sorten eine hohe Ähnlichkeit zueinander aufweisen und somit sehr eng miteinander verwandt sind. Bei den Versuchen konnte klar festgehalten werden, dass 80,5% der 200 untersuchten Bins Marker sind, die lediglich Polymorphismen zu den Wildformen der Out-groups aufwiesen. Mit diesen Markern konnte keine Aussage zu den Polymorphismen zwischen den Genoveser-Sorten gemacht werden. Nur 19,5% der 200 Marker zeigten Sortenpolymorphismus und dies ist verhältnismäßig eine sehr geringe Datenmenge. Ein weiterer Nachteil der Untersuchungen war die geringe Probenmenge, die aus nur drei Individuen stammte.

Die untersuchten Genoveser-Sorten stammen von der Art *O. basilicum*, was die enge Verwandtschaft der Sorten erklärt. Im Laufe des Züchtungsprozesses des Genoveser Types sind immer wieder Sorten des gleichen Types miteinander gekreuzt worden, um neue Sorten zu erzeugen und die Eigenschaften bzw. Merkmale zu verbessern.

Mit den Selbstungen aus der letzten Rückkreuzung wurden resistente bzw. wenig anfällige Basilikumpflanzen generiert, die geselbstet wurden. Unter diesen Selbstungs-Nachkommen erwies sich eine Vielzahl als wenig anfällig bzw. als resistent gegenüber dem FM. Es bedarf jedoch weiterer Selbstungen und Resistenzprüfungen, um die Stabilität dieser erlangten Resistenz zu prüfen bzw. die Homogenität des Genotyps bzw. deren Nachkommen. Die Untersuchung der Homogenität der Basilikumsorten mittels AFLP-Technik verdeutlichen, dass eine gewisse genetische Variabilität in einer Sorte auftreten kann. Diese beträgt z.B. bei der Sorte BAVIRES ca. 4%. Es sind jedoch weitere Untersuchungen mit größeren Stichproben notwendig.

### **5.1.3 Regulierung der relativen Luftfeuchtigkeit im Bestand von Basilikum**

Mit Hilfe der Wärmezufuhr (Vorlauftemperatur von 40°C) über installierte Heizrohre konnte die rF innerhalb des Bestandes reduziert werden, wobei drei verschiedene Heizrohrabstände: 22 cm, 15 cm und 9 cm zum Tischboden geprüft wurden. Die niedrigste rF im Bestand von Basilikum konnte bei

einem Abstand der Heizrohre von 15 und 9 cm zum Tischboden erzielt werden. Um die epidemische Ausbreitung des FM und die Krankheitsentwicklung im Basilikum feststellen zu können, wurden Töpfe mit FM infizierten Pflanzen in den Bestand ausgebracht und der Befall nach ca. zehn Tagen bonitiert. In den mehrmalig wiederholten Versuchen konnte bestätigt werden, dass die Ausbreitung des Erregers auf den Tischen mit Heizrohren (15 cm Abstand) gehemmt/bzw. deutlich verzögert werden kann. Die epidemiologische Entwicklung des FM kann jedoch nicht vollständig verhindert werden. Dies ist allerdings abhängig vom vorliegenden Schaderregerdruck.

Das Installieren von Heizrohren in den Bestand ist eine kostspielige Investition, dennoch eine sichere Methode, um den Krankheitsausbruch mit FM (und eventuell andere Erreger wie Botrytis) und dessen epidemische Verbreitung zu verhindern bzw. deutlich zu verzögern. Die Wärmezufuhr in den Bestand beschleunigt zudem die Entwicklung der Kultur.

Auch einige Pflanzen der F3BC3-S1 Generation, die am Ende des Rückkreuzungsprogramms als wenig anfällig selektiert waren, zeigten in einem Kulturführungsversuch einen Befall. Im Vergleich dazu wies die Sorte BAVIRES eine hohe Befallshäufigkeit auf. Von den insgesamt geprüften Individuen der F3BC3-S1 Generation in den beiden Gewächshauskabinen (ca. 1600 ausgesäte Körner) zeigten insgesamt nur 10 Pflanzen einen Befall mit FM, v.a. auf den Tischen, die nicht beheizt waren.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse des Teilprojektes GHG**

### **5.2.1 Erstellung und Charakterisierung einer NILs Population von Basilikum - GHG**

Der Aufbau und die Weiterführung der zufälligen NIL-Populationen wurden wie geplant durchgeführt. Warum die Drift der morphologischen Merkmale und des Geruchs in Richtung des Genoveser Typs nicht kontinuierlich sondern sprunghaft nach den Rückkreuzungen des Jahres 2015 (also zur Merkmalsausprägung im Jahr 2016) stattfand, lässt sich schwer erklären. Es könnte mit der zufälligen Auswahl der für die Kreuzung selektierten Pflanzen anhand des Ertragsmerkmals zu tun haben. In diesem Fall müssten die Kornzahlen je Pflanze des ursprünglich eingekreuzten Resistenzträgers („Heiliges Basilikum“) prinzipiell höher sein als die des Genoveser Typs (Sorte BAVIRES) – was aber nicht überprüft wurde. Andererseits wäre es auch denkbar, dass es aufgrund der unterschiedlichen Chromosomenzahlen beider Eltern länger dauerte, bis die DNA des Genoveser Typs sich stärker angereichert hat. Das im Samenhandel erworbene Saatgut des „Heiligen Basilikums“ müsste demnach *Ocimum tenuiflorum* entsprechen und 36 Chromosomen haben. *Ocimum basilicum* hat demgegenüber 48 Chromosomen (Eckelmann 2003). Chromosomenzählungen wurden aber im Rahmen unseres Projektes nicht durchgeführt.

## 6. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Kurz- und mittelfristig werden die Erfolgsaussichten als hoch eingestuft. Da der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in der Kräuterproduktion mit hohen Auflagen verbunden ist, ist die Entwicklung einer oder mehrerer resistenter Basilikum-Sorten mittelfristig ein Weg zur sicheren Produktion von Basilikum. Durch ein gezieltes Rückkreuzungsprogramm konnten genetische Ressourcen aus Wildformen nutzbar gemacht werden. Als Ergebnis dieser Rückkreuzungen konnten etwa 140 Pflanzen aus den Selbstungen der 3. Rückkreuzung (F3BC3), die keinen oder nur einen geringen Befall zeigten, erfasst werden. Alle nicht bzw. wenig anfälligen Pflanzen, die den Merkmalen des Genoveser Typs am stärksten entsprachen, wurden ausgesucht und als Zuchtmaterial für Basilikum mit eingekreuzter ‚Resistenz‘ der GHG zur Verfügung gestellt.

Die Charakterisierung des Zuchtmaterials mit Hilfe molekularer Marker erwies sich als nicht durchführbar, da keine klare (monogene) Resistenz in den Nachkommen und den Donor-Eltern mehr zu finden waren.

Bei der Prüfung der Krankheitsentwicklung in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit im Bestand von Basilikum war festzustellen, dass die Installation von Heizrohren in einem Abstand von 15 cm zum Tisch zu einer Reduzierung der epidemischen Ausbreitung von FM im Bestand führen kann. Diese effektive Kulturführungs-Maßnahme trägt wesentlich zum Krankheitsmanagement im Basilikum-Anbau bei (auch gegen andere Krankheitserreger).

## 7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Ziele

Die wichtigsten wissenschaftlichen Ziele des Vorhabens waren:

### AP 1 - Herstellung einer NILS-Population

1. Erstellung und Charakterisierung einer Population von NILs von Basilikum (GHG/IGZ)
  - Selektion von mindestens 10 NILs mit Resistenz gegenüber *P. belbahrii*
    - Am Ende des Projektes konnten aus den Rückkreuzungen etwa 140 Pflanzen aus den Selbstungen der 3. Rückkreuzung (F3BC3), die keinen oder nur einen geringen Befall zeigten, erfasst werden. Da zu Beginn des Projektes von einer monogenen rezessiven oder dominanten Resistenzvererbung ausgegangen wurde, waren 10 NILs als Ziel gesetzt. Es wird jetzt jedoch vermutet, dass es sich hier um polygen gesteuerte Resistenzmechanismen handelt, sodass die F3BC3-S1 Nachkommen nicht als NILs bezeichnet werden können. Weiterführende Fragestellung: Es ist von großem Interesse, ob die erlangte IR der F3BC3-S1 Pflanzen in ihren Selbstungs-Nachkommen stabil bleibt.
  - Selektion von 90 NILs mit zufälligem Teil des Genoms des Donor-Elters

- Am Ende des Projektes, nach 3 Anbaujahren, waren noch 82 der ursprünglich im ersten Jahr angebauten 90 zufälligen NILs vorhanden.
- 2. Selektion von Linien mit Resistenz gegen den FM (IGZ/GHG)
  - Sammlung von *P. belbahrii* Isolaten aus Praxisbetrieben und deren genotypische Charakterisierung mittels BOX-PCR
    - Im Verlauf des Projektes konnten insgesamt 11 Isolate gesammelt werden. Diese wurden mittels BOX-PCR genotypisch charakterisiert. Die Isolate konnten in Gruppen mit vergleichbaren Fingerprints aufgeteilt werden. Die Diversität der Fingerprints zeigt, dass es sich um verschiedene Genotypen von unterschiedlicher Herkunft handelt.
  - Prüfung der Resistenz gegenüber *P. belbahrii* an allen der folgenden Rückkreuzungsgenerationen, jeweils anhand von deren Selbstungsnachkommenschaft
    - Siehe Punkt 1
- 3. Molekulare Charakterisierung der NILS (IGZ)
  - Anpassung der AFLP-Methodik und Validierung für die Nutzung an Basilikum
    - Es konnte eine AFLP-Methodik für Basilikum angepasst und validiert werden
  - Aufbau einer Kartierungspopulation
    - Aufbau einer Kartierungspopulation war nicht möglich, da zu Beginn festgestellt wurde, dass die Resistenz nicht monogen vererbt wird.
    - Aufgrund des umfangreichen Rückkreuzungsprogramms mit dem Ziel, resistente Nachkommen zu generieren, mussten viele Kreuzungen durchgeführt werden. Die generierten Nachkommenschaften wurden entgegen dem ursprünglichen Ansatz vegetativ vermehrt, um einheitliches Material für die Kreuzungen zur Verfügung zu stellen. Nicht nur die Vielzahl an Nachkommenschaften, sondern auch deren vegetative Vermehrung erforderte einen höheren zeitlichen Aufwand als ursprünglich angenommen.
  - Aufklärung des Erbgangs in den einzelnen Selbstungs- und Rückkreuzungspopulationen
    - Aufklärung des Erbgangs in den einzelnen Selbstungs- und Rückkreuzungspopulationen konnte nicht durchgeführt werden, da der Erbgang in der F1 und F2 nicht geprüft werden konnte und die Donor-Eltern nicht mehr resistent waren.
  - Identifizierung von AFLP-Markern für die Resistenz
    - Identifizierung von AFLP-Markern für die Resistenz konnte nicht durchgeführt werden, da es sich bei der Vererbung der Resistenz um ein quantitatives Merkmal handelt.

## **AP 2 - Regulierung der relativen Luftfeuchtigkeit in der Topfkultur**

- 4. Regulierung der Blattnässedauer (BND) in der Topfkultur (IGZ)
  - Ermittlung der BND bei derzeit üblicher Pflanzendichte in der Topfkultur
    - Statt BND wurde die relative Luftfeuchtigkeit im Bestand erfasst, da das Messen von BND sehr punktuell an einer Stelle des Blattes stattgefunden hätte.

- Prüfung der Krankheitsentwicklung in Abhängigkeit von der BND an Basilikum
  - Die Verbreitung des FM und die Krankheitsentwicklung im Bestand von Basilikum konnten erfolgreich mit Hilfe von Wärmezufuhr (40°C) und somit Reduzierung der relativen Luftfeuchtigkeit im Bestand eingeschränkt werden.

## 8. Zusammenfassung

Nach Auffinden von gegenüber dem FM resistentem Basilikummaterial (siehe Projekt FKZ: 28-1-41.012-06) wurden Kreuzungen von anfälligem Genoveser-Typ und resistenter Wildform (Apfelbasilikum) mit dem Ziel durchgeführt, eine Resistenz in den von Verbraucher und Produzenten bevorzugtem Genoveser-Typ zu bekommen. Die Einkreuzung der Eigenschaften des Genoveser-Typs in den der resistenten der Wildform noch sehr ähnlichen F3-Nachkommen erforderte mehrere Rückkreuzungen und die Überprüfung der Nachkommenschaft auf Resistenz gegenüber dem FM. Im Folgenden sind die wesentlichen Schritte beschrieben: Resistentes F2-Zuchtmaterial, generiert aus Kreuzungen von anfälligen Genoveser Basilikumsorten (BAVIREN und BARONESS) und einer resistenten Wildform (Apfelbasilikum), wurde von GHG Saaten in Aschersleben bis zur Saatgutreife kultiviert und das Saatgut (= F3-Nachkommen) geerntet. Insgesamt wurden 3059 Pflanzen der F3-Nachkommenschaft auf Resistenz gegenüber dem FM (*Peronospora belbahrii*) geprüft. Im Ergebnis dieser Prüfungen erwiesen sich acht Genotypen als resistent gegenüber dem FM. Rückkreuzung 1: Diese als resistent eingestuften acht Genotypen wurden erstmals mit anfälligen Genoveser-Typen (Sorten BAVIREN und BARONESS) rückgekreuzt (=Rückkreuzung 1). Die Sorten BAVIREN und BARONESS dienten sowohl als Vater- als auch als Mutterpflanzen (reziproke Kreuzung). Die Kreuzungsprodukte (=F3BC1-Nachkommen) wurden wiederum auf Resistenz gegenüber dem FM geprüft. Im Ergebnis wiesen vier Einzelpflanzen (58M1, 58M2, 58M3 und 58M4) eine geringe Befallsstärke auf. Rückkreuzung 2: Diese vier leicht anfälligen Pflanzen 58M1, 58M2, 58M3 und 58M4 F3BC2-Nachkommen wurden zunächst vegetativ vermehrt und anschließend mit BARONESS rückgekreuzt und die Nachkommenschaft auf Resistenz gegenüber dem FM geprüft. Unter der F3BC2-Nachkommenschaft wiesen wiederum nur wenige Pflanzen eine geringe Befallsstärke an FM auf. Rückkreuzung 3: Diese wurden nochmals mit der Sorte BARONESS rückgekreuzt (= F3BC3-Nachkommen) und bis zur Samenreife kultiviert, die Samen geerntet und die Nachkommen auf Resistenz gegenüber dem FM geprüft. Im Ergebnis dieser Prüfung zeigte sich ebenfalls nur eine geringe Anzahl an Pflanzen als wenig anfällig. Diese Pflanzen wurden im Gewächshaus bis zur Samenreife kultiviert. Selbstung: Zum Abschluss wurden die Nachkommen der F3BC3-Nachkommen geselbstet und auf Resistenz gegenüber FM geprüft. Im Ergebnis dieser Prüfung waren etwa 140 Pflanzen nicht bzw. wenig anfällig. Diese Pflanzen konnten weitestgehend die gewünschten Eigenschaften des Genoveser-Typs in Habitus und Geschmack aufweisen und wurden in das Zuchtprogramm des GHG aufgenommen.

Die Prüfung der Isolate von *P. belbahrii* auf Pathogenität an den Genoveser Sorten BAVIRES und ‚Eleonora‘ zeigten, dass bis auf ein Isolat, das aus Saatgut von 2007 geerntet worden war, alle Isolate ähnlich hochvirulent waren. BAVIRES war bei diesen Test höher anfällig als ‚Eleonora‘, bei der die Befallsstärke mit FM aber auch über 50% befallene Blattfläche betrug. Die genotypische Charakterisierung der Isolate mittels BOX-PCR zeigte, dass die Isolate in Gruppen mit vergleichbaren Fingerprints aufgeteilt werden konnten. Die Diversität der Fingerprints zeigte, dass es sich um verschiedene Genotypen unterschiedlicher Herkunft handelte.

In einem zusätzlichen AP sollte geprüft werden, ob durch Maßnahmen der Kulturführung, die sich auf eine Reduzierung der Blattnässe und Blattnässedauer konzentrieren, die epidemische Entwicklung des Falschen Mehltau an Basilikum in der Topfkultur signifikant verhindert werden kann. Dieses AP wurde nachträglich in das Projekt aufgenommen. Eine Reduzierung der Blattnässe und Blattnässedauer soll durch direkte Wärmezufuhr über Heizschlangen in oder über dem Bestand erreicht werden. Am IGZ wurden dazu Gewächshauskabinen entsprechend ausgestattet. In mehreren Sätzen von Basilikum wurde im Vergleich zu einem Bestand ohne Wärmezufuhr die im Bestand gegebene rF in Abhängigkeit von der Vorlauftemperatur (40°C) in den Heizungsrohren und deren Abstand zum Bestand (ca. 9, 15 und 22 cm) bei derzeit üblicher Pflanzendichte und Anbaubedingungen in der Topfkultur im Gewächshaus ermittelt, um eine geeignete Vorlauftemperatur und Position der Heizrohre ohne negative Folgen für das Wachstum von Basilikum auszuwählen. Die Ergebnisse von fünf Versuchen zeigten, dass Heizrohre direkt in der Höhe der Topf-Oberkante (9 cm über dem Tischboden) und 6 cm über der Topfkante (15 cm über dem Tischboden) die niedrigste rel. Luftfeuchtigkeit im Bestand zur Folge hatte. Die epidemiologische Entwicklung des Falschen Mehltaus im Bestand wurde daher in Abhängigkeit von der genannten Wärmezufuhr geprüft. Die Ausbringung des Erregers im Bestand erfolgte mittels infizierter Pflanzen. Es wurde ein Topf mit einer infizierten Pflanze im Bestand aufgestellt und nachfolgend die epidemische Entwicklung bonitiert. Auf den mit Heizrohren ausgestatteten Tischen war die epidemische Ausbreitung des Erregers niedriger als auf Tischen ohne Heizrohre. Eine vollständige Verhinderung der epidemischen Ausbreitung des FM war durch Reduzierung der relativen Feuchtigkeit nicht möglich. Es konnten teilweise Korrelationen zwischen den erfassten Werten der rel. Luftfeuchtigkeit und der Ausbreitung des Erregers im Bestand gezogen werden.

## 9. Literaturverzeichnis

Belbahri L, Calmin G, Pawlowski J, Lefort F (2005) Phylogenetic analysis and Real Time PCR detection of a presumably undescribed Peronospora species on sweet basil and sage. *Mycological Research* 109: 1276-1287

Ben-Naim Y, Falach L, Cohen Y (2015) Resistance against basil downy mildew in *Ocimum* species. *Phytopathology* 105, 778-785

- Borchert T, Gawenda I (2010) Development and application of high-throughput amplified fragment length polymorphism technique in *Calluna vulgaris* (Ericaceae). *Electronic Journal of Biotechnology* 13, no.2
- Djalali Farahani-Kofoet R, Römer P, Grosch R (2012) Systemic spread of downy mildew in basil plant and detection of the pathogen in seed and plant samples. *Mycological Progress* 11 (4): 961-966
- Eckelmann, Sabine: Biodiversität der Gattung *Ocimum* L., insbesondere der Kultursippen. *Schriften zu Genetischen Ressourcen, Zentralstelle für Agrardokumentation und -information (ZADI), Bonn, 2003; <http://www.genres.de/infos/igrreihe.htm>*
- Garibaldi A, Minuto A, Minuto G, Gullino ML (2004) First report of downy mildew on basil (*Ocimum basilicum*) in Italy. *Plant Disease* 88: 312-312
- Garibaldi A, Bertetti D, Gullino ML (2007) Effect of leaf wetness duration and temperature on infection of downy mildew (*Peronospora* sp.) of basil. *Journal of Plant Disease and Protection* 114: 6-8.
- Heller W, Baroffio C (2003) Le mildiou (*Peronospora lamii*) du basilic progresse! *Der Gemüsebau / Le Maraicher* 8: 12-13
- Heller W, Zoller C (2012) Desinfektion von Basilikum-Saatgut ist eine Herausforderung. *Agrarforschung Schweiz* 1 (5): 190-193
- Hospital F (2005) Selection in backcross programmes. *Philosophical transactions of the Royal Society B – Biological Sciences* 360: 1503-1511
- Mithila J, McLean MD, Chen S, Hall C (2012) Development of near-isogenic lines and identification of markers linked to auxinic herbicide resistance in wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) *Pest Management Science* 68: 548-556
- Monforte AJ, Tanksley SD (2000) Development of a set of near isogenic and backcross recombinant inbred lines containing most of the *Lycopersicon hirsutum* genome in a *L. esculentum* genetic background: a tool for gene mapping and gene discovery. *Genome* 43: 803–813
- Pankovic D, Radovanovic N, Jovic S, Satovic Z, Skoric D (2007) Development of co-dominant amplified polymorphic sequence markers for resistance of sunflower to downy mildew race 730. *Plant Breeding* 126: 440-444
- Paran I, Kesseli R, Michelmore R (1991) Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. *Genome* 34: 1021-1027
- Seliger S. AFLP-Fingerprinting bei *Ocimum basilicum* L. Bachelrolarbeit 2017, Deutschland
- Schmidt U (2004) FM an Basilikum. *Gemüse* 3: 30 - 31
- Semagn K, Bjørnstad A, Xu Y (2010) The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Electronic Journal of Biotechnology* DOI: 10.2225/vol13-issue5-fulltext-21.
- Stam P, Zeven AC (1981) The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. *Euphytica* 30: 227-238

Thines M, Telle S, Ploch S, Runge F (2009) Identity of the downy mildew pathogens of basil, coleus and sage with implications for quarantine measures. *Mycological Research* 113: 532-540

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

Wyenandt CA, Simon JE, McGrath MT, Ward DL (2010) Susceptibility of basil cultivars and breeding lines to downy mildew (*Peronospora belbahrii*). *Horticulturae Science* 45: 1416-1419

## **10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt; bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse**

3. und 4. Koordinationstreffen zur Problematik Falscher Mehltau an Basilikum im ökologischen und integrierten Anbau (März 2014; 2015): „Falscher Mehltau an Basilikum“; Rita Grosch & Roxana Djalali Farahani-Kofoet

Herb & Rucola Day- 09. September 2015/Dannstadt: “Basil Downy Mildew - How to Tackle the Challenge”; Roxana Djalali Farahani-Kofoet

WeGa Symposium DGG-Tagung- sustainable plant protection: 24.2. - 28.2.2015 in Freising: “Basil Downy mildew – biology and searching for resistant genotypes”; Djalali Farahani-Kofoet, Roxana; Römer, Peter; Grosch, Rita

Deutsche Pflanzenschutztagung 20.09. – 23.09.2016: „Reduzierung der Luftfeuchtigkeit zur Kontrolle der epidemischen Ausbreitung des Falschen Mehltaus im Basilikumbestand“; Djalali Farahani-Kofoet, Roxana; Grosch, Rita

Botanikertagung 2017 - Section: Interactions with the Environment: 18.09. – 21.09.2017: “Control of downy mildew spread by reducing the relative humidity in basil crops”; Djalali Farahani-Kofoet, Roxana; Grosch, Rita

Deutsche Gartenbau Gesellschaft Tagung 28. Februar bis 3. März 2018 in Geisenheim: „Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf die epidemische Ausbreitung des Falschen Mehltaus im Basilikumbestand“; Djalali Farahani-Kofoet, Roxana; Grosch, Rita